

UNTERSUCHUNGEN ÜBER WACHSTUMS-
VERHALTEN UND HITZERESISTENZ
SOWIE ENERGIE- UND KOHLENSTOFF-
VERWERTUNG ZWEIER THERMOPHILER
BAKTERIENSTÄMME IN ABHÄNGIGKEIT
VERSCHIEDENER PHYSIKALISCH-CHEMISCHER
MILIEUBEDINGUNGEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Helmut Reiling
aus Letmathe

1976

UNTERSUCHUNGEN ÜBER FLÜSSIGES
VERHALTEN UND VERDAUUNG
SOWIE ENERGIE- UND STOFFVER-
WERDUNG ZWISCHEN VERSCHIEDENEN
BAKTERIENSTÄMMEN IN VERBUNDUNG
VERSCHIEDENER PFLANZEN- UND TIER-
MILCHSÄUREBILDER

VERFAHREN
ZUR ERHEBUNG DER
VERDAUUNGS- UND
ENERGIEVERWERTUNG
VON PFLANZEN- UND
TIERMILCHSÄUREBILDERN

VERFAHREN
ZUR ERHEBUNG DER
VERDAUUNGS- UND
ENERGIEVERWERTUNG



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNTERSUCHUNGEN ÜBER WACHSTUMS-
VERHALTEN UND HITZERESISTENZ
SOWIE ENERGIE- UND KOHLENSTOFF-
VERWERTUNG ZWEIER THERMOPHILER
BAKTERIENSTÄMME IN ABHÄNGIGKEIT
VERSCHIEDENER PHYSIKALISCH-CHEMISCHER
MILIEUBEDINGUNGEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Helmut Reiling
aus Letmathe

1976



1. Referent: Prof. Dr. W. Laskowski
2. Referent: Ass. Prof. Dr. U. Reichert

Tag der mündlichen Prüfung: 18.5.1976

INHALTSVERZEICHNIS

Seite:

Verzeichnis der benutzten Abkürzungen

1.	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	Extreme Umweltbedingungen	1
1.2	Temperatur und Mikroorganismen	2
1.2.1	Temperatureinfluß auf die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Wassers	2
1.2.2	Temperatureinfluß auf chemische und biochemische Reaktionen	5
1.2.3	Temperaturgruppen und biokinetisches Temperaturgebiet	6
1.3	Zur Bedeutung thermophiler Mikroorganismen	8
1.4	Theorien zur Erklärung des Thermophiliephänomens	10
1.4.1	Dynamische Theorie	11
1.4.2	Theorie der außergewöhnlichen Hitzestabilität thermophiler Makromoleküle	13
1.4.3	Lipidtheorie	16
1.4.4	Membrantheorie	17
1.5	Zusammenfassung der beschriebenen Theorien und ihrer experimentellen Beweise. Problemstellung der vorliegenden Arbeit	18
2.	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	22
2.1	Organismen (Charakterisierung und Aufbewahrung)	22
2.2	Nährmedien und Puffer	24
2.3	Vorkulturbedingungen und Vorbereitungen für die Experimente	27
2.4	Wachstumsexperimente zur Energie- und Kohlenstoffverwertung	28

2.4.1	Photometrische Registrierung des Wachstums	30
2.4.2	Kalorimeterexperimente	33
2.5	Umrechnungsfaktoren zur Auswertung der unter (2.4) angefallenen Daten	36
2.5.1	Zusammenhang von Trockengewicht pro Volumeneinheit und Extinktion	37
2.5.2	Verbrennungskalorimetrie	38
2.6	Experimente zur Hitzeresistenz	39
2.6.1	Absterbekinetiken	39
2.6.2	Leakage (Freisetzung organischen Materials)	40
3.	<u>ERGEBNISSE</u>	41
3.1	Nährstofftests für <i>Thermus aquaticus</i> bei der Optimaltemperatur	41
3.2	Trübungsmessungen am Thermomat	45
3.2.1	<i>Thermus aquaticus</i>	45
3.2.2	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	49
3.3	Trockengewicht und Extinktion	49
3.4	Verbrennungswärmen	51
3.5	Trübungsmessungen am Kolorimeter	53
3.5.1	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	53
3.5.1.1	Wachstumsvergleich bei verschiedenen Temperaturen und verschiedenem pH	53
3.5.1.2	Variation der Stickstoffkonzentration	54
3.5.1.3	Variation des Sauerstoffangebots	57
3.5.1.4	Variation der Glucosekonzentration	67
3.5.2	<i>Thermus aquaticus</i>	73

3.6	Kalorimeterexperimente	78
3.6.1	Bacillus stearothermophilus	79
3.6.2	Thermus aquaticus	89
3.7	Hitzeresistenz	91
3.7.1	Absterbekinetiken	91
3.7.1.1	Thermus aquaticus	92
3.7.1.2	Bacillus stearothermophilus	93
3.7.2	Leakage	95
4.	<u>DISKUSSION</u>	97
4.1	Arrheniusdiagramm und Aktivierungsgrößen des Wachstums von Thermus aquaticus	97
4.2	Strukturelle und morphologische Zellver- änderungen mit der Temperatur?	100
4.3	Materieller Wirkungsgrad beim thermophilen Wachstum	103
4.3.1	Einfluß der Glucosekonzentration auf den Gesamtertrag	105
4.3.2	Ertragskoeffizienten und Sauerstoffabhängig- keit des Ertrages	106
4.3.3	Temperaturabhängigkeit des Ertrages	114
4.4	Energetische Bilanz und Wärmeproduktion beim Wachstum	118
4.5	Hitzeresistenz	128
5.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	132
6.	<u>SCHLUSSBEMERKUNG</u>	137
7.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	138

VERZEICHNIS DER BENUTZTEN ABKÜRZUNGEN

ATCC	American Type Culture Collection
CS	Castenholzsalzlösung
CTYEM	Castenholzsalz/Trypton/Yeast Extract-Medium
NCIB	National Collection of Industrial Bacteria
NGCM	NH_4Cl /Glucose/Castenholzsalz-Medium
RGSV	Reagenzgläser mit Schraubverschluß
TG	Trockengewicht
TYE	Trypton/Yeast Extract
YE	Yeast Extract
YNB	Yeast Nitrogen Base mit Aminosäuren

1. EINLEITUNG

1.1 Extreme Umweltbedingungen

Eine Vielzahl von Umweltfaktoren beeinflusst in grundlegender Weise die biologischen Prozesse auf der Erde. Diese chemischen und physikalischen Faktoren - wie z.B. Temperatur, hydrostatischer Druck, pH, Salz- und Wassergehalt, Nährstoffkonzentration, elektromagnetische und ionisierende Strahlung - können in bestimmten ökologischen Nischen Extremwerte annehmen, die ein Überleben der meisten Organismen ausschließen. Je extremer diese Umweltbedingungen sind, desto größer ist der Selektionsdruck, desto geringer sind Artenvielfalt und Organisationsgrad der hier lebensfähigen Organismen, so daß unter Extrembedingungen praktisch nur einzellige Mikroorganismen vorkommen. Unter extremsten Bedingungen finden sich nur noch die wenig differenzierten Prokaryonten.

Übersichten über die Wirkung der verschiedensten extremen Umweltfaktoren geben z.B. die Artikel von BRUES (1932), VALLENTYNE (1963), BROCK (1967a, 1969) und BROCK & DARLAND (1970).

Die drei möglichen Mechanismen, mit deren Hilfe ein Organismus in einer extremen Umwelt überleben kann, sind:

- a) passive Resistenz: Abschirmung gegen den Faktor so weit wie möglich, z.B.: Permeationsbarriere, Schutzhülle
- b) aktive Resistenz: ständiger Überlebenskampf in der feindlichen Umwelt, z.B.: Neusynthese zerstörter Zellkomponenten
- c) Toleranz: der Organismus kann lernen, mit dem Faktor zu leben, durch Adaptation, Mutation, Selektion. Durch diese Prozesse wird die ursprünglich lebensfeindliche Umwelt meist zur optimalen Bedingung für die Existenz des Organismus (BROCK 1967b, BROCK & BROCK 1968, 1971).

Die in dieser Arbeit untersuchte, künstlich geschaffene ökologische Nische ist durch hohe Temperaturen (≥ 50 C) im

wäßrigen Milieu gekennzeichnet. Die entsprechenden natürlichen Hochtemperaturregionen auf der Erde sind vor allem die heißen Quellen und Geysire (Vorkommen in Japan, Island, Neuseeland, USA).

1.2 Temperatur und Mikroorganismen

Bevor auf die Bedeutung thermophiler Mikroorganismen und einige Theorien zur Erklärung des Thermophiliephänomens eingegangen wird, sollen noch einige für die Lebensbedingungen eines Organismus wichtige Gesetzmäßigkeiten und Zusammenhänge angegeben werden, die mit dem Parameter Temperatur verknüpft sind. Außerdem wird die Einteilung der biokinetischen Temperaturzone kurz vorgestellt.

1.2.1 Temperatureinfluß auf die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Wassers

Die Temperatur ist ein idealer Umweltfaktor bei der Untersuchung von im wäßrigen Milieu lebenden Mikroorganismen, da sich die einzelne Zelle im Temperatúrausgleich mit ihrer Umgebung befindet. Diese Identität des Zellparameters mit dem der Umgebung gilt für viele andere mikrobielle Variable (pH, Ionenkonzentration etc.) wahrscheinlich nur sehr selten.

Lebende Zellen sind im wesentlichen wäßrige chemische Systeme (eine Bakterienzelle besteht zu 70 - 85 % aus Wasser). Deshalb beeinflussen die temperaturabhängigen, physikalisch-chemischen Eigenschaften des Wassers (Tab. 1) die Lebensbedingungen eines Organismus in signifikanter Weise. Für drei wichtige Parameter ist die Temperaturabhängigkeit in den Abbildungen 1 und 2 dargestellt:

O₂ - Löslichkeit (Abb. 1): der Temperaturgang der O₂ - Löslichkeit hat große biologische Bedeutung und wirkt sich für aerob - thermophile Organismen negativ aus. Bei 70 C sind nur noch 45 % der bei 20 C gelösten O₂-Menge gelöst.

Tabelle 1: Temperatureffekt auf physikalische und chemische Eigenschaften des Wassers (BROCK 1970)

Eigenschaft	Veränderung bei Temperaturanstieg
<u>physikalisch:</u>	
Dichte	} Abnahme
Viskosität	
Oberflächenspannung	
Dielektrizitätskonstante	
Wärmekapazität	
Kompressibilität	
Brechungsindex	
Volumen	} Zunahme
Dampfdruck	
Diffusion	
<u>chemisch:</u>	
pH	} Abnahme
O ₂ -Löslichkeit	
Ionisation	} Zunahme
Löslichkeit der meisten organischen und anorganischen Substanzen	

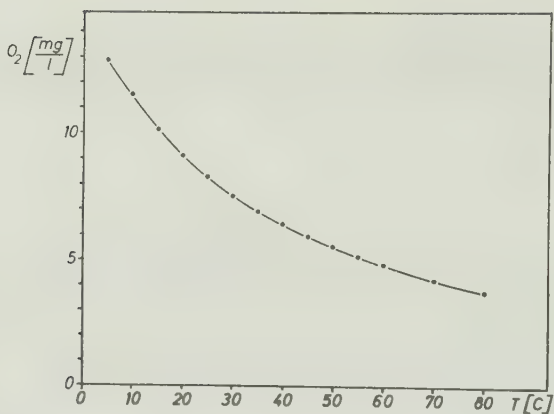


Abb. 1: Temperaturabhängigkeit der O_2 -Sättigungswerte in Wasser

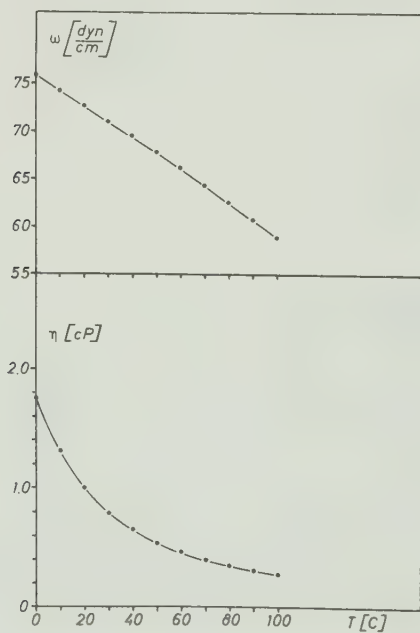


Abb. 2: Temperaturabhängigkeit von Oberflächenspannung (oben) und Viskosität des Wassers (unten)

Oberflächenspannung von Wasser gegen Luft (Abb. 2, oben): ihre Abnahme mit der Temperatur bedeutet biologisch gesehen die Möglichkeit besserer O_2 -Ausnutzung.

Viskosität (Abb. 2, unten): bei höheren Temperaturen sind alle Fließvorgänge beschleunigt, was sich sowohl im Zellbereich als auch beim Grenzflächenaustausch günstig auswirkt.

Die ebenfalls sehr wichtige Variation des O_2 -Diffusionskoeffizienten in H_2O läßt sich durch $D = D_0 \exp (- E_A / kT)$ beschreiben, d.h. mit steigender Temperatur erhält man zunehmende O_2 -Diffusion in Wasser, was den O_2 -Haushalt von Organismen positiv beeinflusst, wirkt sie doch der abnehmenden O_2 -Löslichkeit entgegen.

1.2.2 Temperatureinfluß auf chemische und biochemische Reaktionen

Die Temperaturabhängigkeit chemischer Reaktionen wird durch die sog. Arrhenius-Gleichung ausgedrückt:

$$\ln k = - A/T + B$$

wobei $\ln k$ - natürlicher Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten einer chemischen Umsetzung
 A, B - Konstanten, wobei B ein Maß für die Anzahl der Molekülzusammenstöße darstellt
 T - absolute Temperatur

Die Beziehung postuliert eine mit steigender Temperatur zunehmende Geschwindigkeit chemischer Reaktionen. Die Reaktionsgeschwindigkeit steigt nach einer schon von van't Hoff empirisch gefundenen Regel bei einer Temperaturerhöhung um 10 C auf das 2 - 4fache der zugehörigen Ausgangsgeschwindigkeit an. Man schreibt diese sog. RGT-Regel (Reaktions-Geschwindigkeit-Temperatur-Regel) auch in der Form

$$Q_{10} = k_T + 10 / k_T = 2 - 4$$

wobei die temperaturabhängigen Q_{10} -Werte als Temperatur-

koeffizienten bezeichnet werden. Die Q_{10} -Werte physikalischer Vorgänge (Diffusion, Osmose, Leitfähigkeit, Kernzerfall) liegen niedriger, z.T. (Zerfall, Leitfähigkeit) ist dort $Q_{10} = 1$, d.h. eine solche Reaktion ist temperaturunabhängig.

Biochemische Umsetzungen unterscheiden sich von den rein chemischen Reaktionen nur dadurch, daß die Prozesse praktisch immer enzymkatalysiert sind. Auch hier gelten also obige Gesetzmäßigkeiten. Es ist allerdings zu beachten, daß die bei Temperaturerhöhung ziemlich schnell einsetzende Inaktivierung des katalysierenden Enzyms durch die zur Aufhebung der intramolekularen, nicht kovalenten Bindungen ausreichende thermische Energie die Wirkung der zunehmenden Reaktionsgeschwindigkeit teilweise bis vollständig kompensiert. Die fortschreitende Denaturierung führt zur Konformationsänderung des Enzyms und damit schließlich zum totalen Funktionsverlust, so daß die Arrheniusgleichung keine Gültigkeit mehr hat.

Die nicht ganz unproblematische Anwendung und Übertragung der Gleichung von Arrhenius auf so komplexe biologische Vorgänge wie Wachstum oder einzelne Stoffwechselprozesse wie Sauerstoffverbrauch und CO_2 -Produktion hat zu unterschiedlichen Interpretationen geführt, die unter (4.1) eingehend diskutiert werden.

1.2.3 Temperaturgruppen und biokinetisches Temperaturgebiet

Es hat sich eingebürgert, Mikroorganismen bestimmten Temperaturgruppen zuzuordnen, die grob die Breite des Vermehrungsbereichs und die Lage im gesamten biokinetischen Temperaturgebiet angeben. Diese Daten sind natürlich für jeden Organismus verschieden, dennoch kann man eine Einteilung in drei nicht starr voneinander getrennte Hauptgruppen vornehmen: man unterscheidet psychrophile, mesophile und thermophile Mikroorganismen und gibt sog. Kardinaltemperaturen des Wachstums an: obere und untere Grenztemperatur sowie die Optimal-

temperatur (Tab. 2, etwas modifiziert nach PRECHT et al. 1955).

Tabelle 2: Biokinetisches Temperaturgebiet und Temperaturgruppen

Gruppe	Temperatur-Minimum	Temperatur-Optimum	Temperatur-Maximum
psychrophil	Gefrierpunkt	$\leq 20\text{ C}$	30 C
mesophil	10 C	25 - 40 C	45 - 55 C
thermophil	40 - 45 C	$\geq 55\text{ C}$	$\geq 65\text{ C}$

Eine solche Klassifizierung kann und soll nur ein erster allgemeiner Hinweis darauf sein, ob das Vermehrungsoptimum des untersuchten Organismus eher bei niedrigen (psychrophiler Bereich), mittleren (mesophiler Bereich) oder höheren Temperaturen (thermophiler Bereich) liegt. Die Temperaturoptima anderer biologischer Aktivitäten und Größen müssen nicht mit dem Optimum der Vermehrung zusammenfallen.

Ob es eine obere Temperaturgrenze des Lebens gibt, läßt sich bis heute noch nicht endgültig beantworten. Aufgrund der Entdeckung von beim Siedepunkt des Wassers wachsenden Bakterienarten (BROCK & DARLAND 1970, BOTT & BROCK 1969, BROCK et al. 1971) wird angenommen, daß der mikrobielle Lebensbereich erst durch Temperaturen begrenzt wird, bei denen Wasser nicht mehr in flüssiger Phase existiert. Das bedeutet, daß - unter erhöhten Drucken - Leben prinzipiell bei Temperaturen $\geq 100\text{ C}$ möglich sein sollte. BROCK (1967a) und BROCK & DARLAND (1970) haben allerdings beobachtet, daß die tatsächliche obere Temperaturgrenze durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden kann. So nimmt sie z.B. mit steigender Acidität des Milieus ab.

1.3 Zur Bedeutung thermophiler Mikroorganismen

Die Existenz von lebens- und teilungsfähigen Mikroorganismen bei hohen Temperaturen wurde etwa zu Beginn des 19. Jahrhunderts entdeckt. Es handelte sich dabei um Blaualgen, die aus Geysiren und heißen Quellen isoliert werden konnten. 1888 fand MIQUEL in der Seine die ersten thermophilen Bakterien, die bei 73 C noch ausgezeichnetes Wachstum zeigten. Mittlerweise sind an allen möglichen Standorten viele thermophile Mikroorganismen, hauptsächlich Bakterien, beobachtet worden, von denen die meisten zur Gattung Bacillus gehören; in jüngster Zeit hat man aber auch Bakterien anderer Gattungen gefunden, die z.T. bei extrem hohen Temperaturen wachsen.

Diese außergewöhnlichen Fähigkeiten und Eigenschaften, koordinierte Stoffwechselleistungen bei Temperaturen zu erbringen, die normalerweise das sinnvolle Funktionieren von Lebensprozessen ausschließen, haben die thermophilen Mikroorganismen in letzter Zeit aus folgenden unterschiedlichen Gründen zu einem viel untersuchten Forschungsobjekt werden lassen: da interessieren evolutionstheoretische Fragen ebenso wie die molekularbiologisch-biochemischen Aspekte oder ökologische Probleme, und medizinische, kommerzielle und technologische Gesichtspunkte ebenso wie Fragen der Umweltschutzproblematik.

Im einzelnen: Einige Autoren (BROCK 1967 a, TANAKA et al. 1971) sind der Ansicht, bei den thermophilen Mikroorganismen handele es sich um Ur- oder Frühformen des Lebens, um Relikte aus einer wärmeren Periode der Erdgeschichte, aus denen sich mesophile und psychrophile Lebewesen entwickelt haben. MITCHELL (1974) versucht den Selektionsdruck, der für eine Evolution thermophiler Organismen in heißen Quellen verantwortlich sein könnte, modellmäßig zu erfassen, und zwar unter Einbeziehung der zellulären Funktionen und der Gegebenheiten der natürlichen Ressourcen als denjenigen beiden Faktoren, die die physiologischen und ökologischen Grenzen des Wachstums setzen. So könnte das Studium der biochemischen Reaktionen wie

der Ausnutzung der verfügbaren Energie- und Nahrungsquellen bei thermophilen Organismen ganz allgemein Hinweise auf die Evolution lebender Systeme geben.

In der angewandten Ökologie ist es wichtig, die Konsequenzen industrieller Wärmequellen kennenzulernen, da diese zwangsläufig eine starke Vermehrung thermophiler Populationen zur Folge haben. Die Entwicklung thermisch kontaminierter Gewässer muß sorgfältig kontrolliert werden, da man nicht weiß - ganz abgesehen von der unbewiesenen Annahme, daß thermophile Organismen nicht pathogen sind und ebenso abgesehen von den weiteren Auswirkungen der erwärmten Kühl- und Abwässer (z.B. verringertes O_2 -Angebot) - auf welche Weise diese Organismen das ökologische Gleichgewicht der Gewässer beeinflussen können (SINGLETON & AMELUNXEN 1973).

Weiterhin spielen thermophile Mikroorganismen und ihre Proteine eine Rolle bei industriellen Produktionsprozessen: Medizinische wie kommerzielle Aspekte sind in der Nahrungsmittelindustrie betroffen, obschon das Problem der hitzeresistenten Sporen größer ist. Die fortschreitende Anwendung biologisch-biochemischer Systeme in der industriellen Technologie hat darüberhinaus den Vorteil des Einsatzes von thermophilen Proteinen, insbesondere Enzymen, für verschiedenste industrielle Prozesse erkennen lassen (DOIG 1973/74, DELENTE et al. 1974).

Neuerdings wird die Stoffwechselleistung thermophiler Organismen auch zum hygienischen Abbau hochkonzentrierter organischer Abwässer, wie sie z.B. bei der heutigen Massentierhaltung, bei der Futtermittelherstellung und in der Nahrungsmittelindustrie anfallen, eingesetzt. Diese aerob-thermophilen Abbauverfahren haben sich schon in vielen Fällen leistungsfähiger als die üblichen biologischen Reinigungstechniken erwiesen (LOLL 1974). Die von den - zunächst psychrophilen, dann mesophilen - Organismen bei der biochemischen Oxidation organischer Substanzen freigesetzte Wärme

dient zur Reaktionsbeschleunigung der Abbauprozesse, die bei weiter erhöhten Temperaturen durch thermophile Mikroorganismen selbsttätig in Gang gehalten werden, was zur Vernichtung pathogener Keime führt. Durch den aerob-thermophilen Abbau des Abwassers werden außerdem Geruchsbelästigung und Grundwassergefährdung durch stickstoffhaltige Verbindungen vermieden, sowie leicht weiter zu verarbeitende ungefährliche Rückstände erhalten.

Bei den Abbauprozessen entstehen beachtliche Beträge an Energie in Form von Wärme. Neben deren Ausnutzung für die aerob-thermophile Flüssigkompostierung (durch Abschluß des Systems) beinhalten die freigesetzten Wärmemengen eine zumindest theoretische Möglichkeit einer neuen Art der Energieversorgung, denn die produzierte Wärme vermag durchaus herkömmliche Energiequellen des alltäglichen Lebens zu ersetzen. So berechnen LAMPRECHT & SCHAARSCHMIDT (1974), daß der jährliche Dung von 11 Kühen, aerob-thermophil abgebaut, den jährlichen Energiebedarf eines Vierpersonenhaushalts decken könnte.

1.4 Theorien zur Erklärung des Thermophiliephänomens

Die Entdeckung und Untersuchung thermophiler Mikroorganismen hat zwei Fragenkomplexe aufgeworfen:

- a) wie können sie bei den beobachteten hohen Temperaturen überleben?
- b) warum können sie im mesophilen Temperaturbereich nicht wachsen?

Zur Erklärung dieser Phänomene sind verschiedene Theorien vorgeschlagen worden, von denen die vier wichtigsten im folgenden skizziert werden sollen (s. auch CRISAN 1973, SINGLETON & AMELUNXEN 1973, CHRISTOPHERSEN 1973).

1.4.1 Dynamische Theorie

Die dynamische Theorie (ALLEN 1950, 1953, GAUGHRAN 1947a, 1947b) besagt, daß das Thermophiliephänomen nicht auf ein passives Resistenzproblem, d.h. auf ungewöhnlich hitzestabile zelluläre Makromoleküle, zurückzuführen ist, sondern die Möglichkeit bestimmter Organismen aufzeigt, bei hohen Temperaturen aufgrund intensiver Stoffwechselvorgänge zu überleben. Nach dieser Theorie sollen die thermophilen wie die mesophilen Zellkomponenten durch Hitze denaturiert werden, was jedoch - im Gegensatz zu den mesophilen Organismen - die thermophilen Organismen solange kompensieren könnten, wie ein genügend großes Nährstoffangebot zur Verfügung steht. Dann nämlich könnte das hitzgeschädigte Zellmaterial entweder durch ein temperaturstabiles Reparatursystem repariert oder durch einen Synthesemechanismus mit einer solchen Rate ersetzt werden, daß der gesamte Stoffwechsel der Zelle ohne Störung aufrechterhalten werden kann. Das bedeutet, daß die dynamische Theorie doch nicht ohne die Annahme der Thermostabilität zumindest einiger Gruppen von Makromolekülen (für das Reparatur- bzw. Synthesesystem) auskommt. Wenn die thermische Inaktivierung der Zellbestandteile die Leistungsfähigkeit des Reparatur- oder Syntheseapparats übertrifft, soll die Maximaltemperatur für den betreffenden Organismus überschritten sein.

Bei fehlendem Nährstoffangebot ist natürlich die für Reparatur bzw. Synthese notwendige Energiezufuhr nicht mehr vorhanden.

Die Annahme der Hitzelabilität fast sämtlicher thermophiler Zellkomponenten wurde in der Folgezeit stark angezweifelt und kann aufgrund neuerer Erkenntnisse auch nicht mehr gehalten werden (s. Theorie 1.4.2). Ebenso konnten die im Vergleich zu den mesophilen Organismen hohen Biosynthese- und Umsatzraten von KOFFLER (1957) und EPSTEIN & GROSSOWICZ (1969b) nicht bestätigt werden. Ein weiteres Argument gegen die

dynamische Theorie sieht BROCK (1967a) in den Hitzeabtötungskurven thermophiler - und auch mesophiler - Mikroorganismen, die meist eine Kinetik erster Ordnung repräsentieren. Der Tod einer Zelle durch thermische Zerstörung vieler hitzesensibler Enzyme und Ribosomen sollte aber nach einer anderen Kinetik verlaufen (INGRAHAM 1962).

Untersuchungen von JANOTA-BASSALIK & DZIECHCIARZ (1970) an *Bacillus megaterium* hingegen unterstützen die ALLEN'sche Hypothese, und Beobachtungen von BUBELA & HOLDSWORTH (1966a, 1966b) zeigten, daß thermophile im Vergleich zu mesophilen Mikroorganismen (*B. stearothermophilus* - *E. coli*) überdurchschnittlich hohe Synthese- und Umsatzraten von Nukleinsäuren und Proteinen aufwiesen. Gesteigerte Proteinsyntheseraten bei *Bacillus coagulans* (55 C) gegenüber *B. coagulans* (37 C) vermuten auch NOVITSKY et al. (1974). Erhöhter Proteinabbau in der löslichen Proteinfraction wurde bei thermotoleranten Pilzen gefunden (MILLER et al. 1973, MILLER et al. 1974). Weiter läßt die von Mc FETERS & ULRICH (1972) an *Thermus aquaticus* registrierte vierfach verstärkte O_2 -Aufnahmerate bei 70 C gegenüber 50 C auf äußerst intensive Stoffwechselvorgänge bei hohen Temperaturen schließen. Die Autoren interpretieren ihr Ergebnis als eine Veränderung des Elektronentransportsystems bei thermophilen Mikroorganismen im Vergleich zu mesophilen. POZMOGOVA et al. (1974) errechneten einen gegenüber mesophilen Mikroorganismen doppelt so hohen O_2 -Verbrauch pro mg produzierten Trockengewichts bei thermophilen Organismen und vermuten eine Entkopplung von Energieproduktions- und Syntheseprozessen. Geringerer Ertrag ist aber gerade bei Annahme der Gültigkeit der dynamischen Theorie zu erwarten.

Die dynamische Theorie ist nicht imstande, das Auftreten der Minimaltemperatur eines thermophilen Mikroorganismus zu erklären.

1.4.2 Theorie der außergewöhnlichen Hitzestabilität thermophiler Makromoleküle

In den letzten fünfzehn Jahren ist bei einer großen Anzahl thermophiler Biomakromoleküle (Proteine, Ribosomen, RNA, DNA) verschiedenster Organismen eine gegenüber den entsprechenden mesophilen Zellbestandteilen deutlich gesteigerte Hitzeresistenz festgestellt worden. Ausführliche Angaben und Zusammenfassungen über einen großen Teil der vorliegenden Ergebnisse finden sich bei FARRELL & ROSE (1967a, 1967b), FRIEDMAN (1968), ZEIKUS & BROCK (1971), SINGLETON & AMELUNXEN (1973), CRISAN (1973), CHRISTOPHERSEN (1973), DOIG (1973/74). Schwierigkeiten bei all diesen Stabilitäts- und Aktivitätsanalysen bei hohen Temperaturen in vitro bereitet die Beantwortung der Frage, worauf die große Hitzeresistenz zurückzuführen ist: handelt es sich um eine Eigenschaft der Makromoleküle selbst (intrinsic thermostability, inherent heat stability) oder wird sie durch externe Stabilisierungsfaktoren im Zellextrakt und erst recht in der Zelle erreicht? Dabei sind die Nukleinsäuren und Ribosomen nicht das Problem, da sie auch bei mesophilen Organismen hohe Schmelztemperaturen besitzen. Dennoch wird auch hier häufig von höheren T_m -Werten (ZEIKUS et al. 1970, FRIEDMAN 1971) bzw. von einem höheren G + C-Gehalt berichtet, was ja auf eine durch vermehrte Wasserstoffbrückenbildung stabilisierte Struktur schließen läßt. Konzepte jedoch, den T_m -Wert der ribosomalen Denaturierungskurve mit der Maximaltemperatur des Wachstums extrem thermophiler Bakterien zu korrelieren (PACE & CAMBELL 1967, ZEIKUS et al. 1970, ZEIKUS & WOLFE 1972) scheinen nicht schlüssig zu sein, da die Maximaltemperatur, wie auch eigene Versuche ergaben, z.B. deutlich von der Medienzusammensetzung abhängig ist.

Interessanter scheint die Frage nach den Ursachen der Hitzestabilität von Proteinen zu sein. Die meisten Autoren halten die Hitzeresistenz für eine Eigenschaft der thermophilen Moleküle selbst.

Eine solche "inherent thermostability" könnte prinzipiell erreicht werden durch eine

- a) Konformationsänderung der Moleküle bis zur random coil-Struktur, wie von MANNING & CAMPBELL (1961), MANNING et al. (1961) anhand einer extrazellulären α -Amylase von *Bacillus stearothermophilus*, die völlig aktiv war, beschrieben wurde, was von PFUELLER & ELLIOTT (1969) jedoch nicht bestätigt werden konnte. Strukturelle Enzymveränderungen mit der Temperatur, wenn auch nicht so drastisch, beobachteten auch HACHIMORI et al. (1970), STELLWAGEN et al. (1973), SAIKI et al. (1973), WEDLER & HOFFMANN (1974), SHOAF et al. (1974), MATSUNAGA & NOSOH (1974) und SCHAUPP & LJUNGDAHL (1974).
- b) Vermehrung des Anteils hydrophober Aminosäuregruppen, eine Möglichkeit, die von BRANDTS (1967) zur Diskussion gestellt wurde. Dadurch könnten "trockene" intramolekulare Regionen entstehen, die eine verstärkte Stabilität des Moleküls zur Folge haben würden. Entsprechende Enzyme sind auch schon entdeckt worden (LJUNGDAHL et al. 1970, OHTA et al. 1966).
- c) Bindungsverstärkung durch Wasserstoffbrücken zwischen basischen Aminosäuren (BARNES & STELLWAGEN 1973).

Dennoch sind bis heute chemische oder strukturelle Unterschiede zu den entsprechenden Molekülen mesophiler Organismen nur selten festgestellt worden.

LJUNGER (1970, 1973) hält dagegen die - externe - Molekülstabilisierung durch anorganische Ionen, besonders Ca^{2+} -Ionen, für erwiesen. Deren Schutzfunktion gegen die Hitzedenaturierung sieht er in möglichen reversiblen Reaktionen (intramolekulare Vernetzung, Abblocken hydrophiler Gruppen, dadurch Hydratationsverringering - wie Fall b)).

In vivo können aber auch noch vielerlei andere externe Stabilisierungsmöglichkeiten, z.B. durch Substratmoleküle (PARFAIT

1973, HIBINO et al. 1974, HENGARTNER & ZUBER 1973), eine wichtige Rolle spielen

Eine derartige Stabilisierung - ob "inherent" oder durch externe Faktoren erreicht - muß nicht notwendigerweise einen (teilweisen) Funktionsverlust des Proteins bedingen, wie BROCK (1967 a) meint. HACHIMORI et al. (1974) berichten von Versuchen, die gezeigt haben, daß thermophile Bakterien regulatorische Enzyme produzieren können, die sowohl katalytisch aktiv als auch sensitiv für allosterische Regulation bei hohen Temperaturen sind.

Insgesamt läßt sich sagen, daß der Proteinsynthesemechanismus thermophiler Mikroorganismen höchstwahrscheinlich hitzeresistenter ist als derjenige der mesophilen Organismen. Einzelne Enzyme oder Proteine können durchaus hitzelabil sein, entsprechende Schäden dürften von der Zelle zu beheben sein, so daß sie bei hohen Temperaturen lebensfähig bleibt. Ein allgemein gültiger Hitzeresistenzmechanismus für sämtliche Thermophilen scheint zu fehlen. Einzelne Proteine (oder bestimmte kleine Gruppen von Proteinen) werden vermutlich stabilisiert durch bestimmte Eigenschaften oder Mechanismen, die nicht übertragbar auf andere Proteine sind (GRIFFITHS & SUNDARAM 1973).

Die Theorie könnte die Minimaltemperatur eines Organismus dadurch erklären, daß die stabilisierten Enzyme bei niedrigeren Temperaturen nicht katalytisch aktiv und/oder regulatorisch wirksam sein können (BABEL et al. 1972). BUBELA & HOLDSWORTH (1966b) meinen, daß bei tieferen Temperaturen die notwendige Aktivierungsenergie z.B. für Substrataufnahme nicht mehr erbracht werden kann. Daß die Aktivierungsenergien für Substrataufnahme und -inkorporation bei den niederen Temperaturen größer sind als bei höheren Temperaturen zeigen die vielen Daten der gebrochenen Arrheniusdiagramme an (Literatur: Punkt a).

1.4.3 Lipidtheorie

Die Lipidtheorie geht davon aus, daß die thermische Zerstörung einer Zelle dann eintritt, wenn die zellulären Lipidverbände anfangen, zu schmelzen. Schon HEILBRUNN (1924) und BELEHRADEK (1931) nahmen an, daß die Lipide für die Aufrechterhaltung einer gewissen Stabilität des Zellplasmas und der Zellmembran verantwortlich seien. Darüber hinaus erkannten sie, daß der Schmelzpunkt zellulärer Lipidverbände mit der Wachstumstemperatur des Organismus ansteigt. Mittlerweile hat sich herausgestellt, daß mit steigender Wachstumstemperatur der Anteil gesättigter, längerer und verzweigtkettiger Fettsäuren zunimmt, was eine größere Hitzestabilität thermophiler Lipidaggregationen im Vergleich zu denen der mesophilen Organismen erklären könnte (HEINEN et al. 1970, SHEN et al. 1970, CHAN et al. 1971, RAY et al. 1971a, SOUZA et al. 1974). Für die Stabilität wesentlich sind allerdings nur - im Gegensatz zu HEILBRUNN's und BELEHRADEK's Ansicht - die Membranlipide, da die Plasmalipide eher als Energie- und Nährstoffspeicher anzusehen sind.

Studien an synthetischen Membranen und an Membranen lebender Zellen haben nun in einigen Fällen gezeigt, daß die strukturellen und funktionellen Membraneigenschaften mit der Natur der Phospholipidkomponente der Membranen korreliert sind. Diese Phospholipide besitzen mehrphasige Eigenschaften und gestatten einer Membran eine sinnvolle Funktion nur in der Nähe des Umwandlungspunktes von der kristallinen in die flüssige Phase (CHAPMAN 1967, 1969, 1970, DOWBEN 1969). Hingegen messen RAY et al. (1971b) und OSHIMA & YAMAKAWA (1974) den Glycolipiden der Membranen besondere Bedeutung als Stabilisierungsfaktoren zu.

Das Problem der Minimaltemperatur wird mit dieser Theorie dadurch gelöst, daß man zum sinnvollen Funktionieren der Zellabläufe einigermaßen flexible Zellkomponenten voraussetzen muß. Bei der Minimaltemperatur sollen die Lipide aber er-

starren, so daß keine oder kaum noch (unendlich langsam vor sich gehende) Stoffwechselleistungen möglich sind.

1.4.4 Membrantheorie

Die Membrantheorie hängt wegen der Zusammensetzung der Membranen aus Lipiden und Proteinen eng mit den unter 1.4.2 und 1.4.3 abgehandelten Theorien zusammen. Sie verlagert aber die Diskussion der Hitzestabilität thermophiler Mikroorganismen von der molekularen Ebene auf die Ebene der Zellstrukturen.

BROCK (1967a) ist der Ansicht, der Verlauf der Absterbekinetiken vieler Mikroorganismen (Kinetik erster Ordnung) lege nahe, eher als die Inaktivierung eines Enzyms oder mehrerer verschiedenartiger Makromoleküle, von denen es ja mehr als nur eine Kopie in der Zelle gibt, einen Schaden an einer größeren Zellstruktur wie z.B. der Zellmembran anzunehmen. Denn schon ein Loch in der Membran bedeutet das Herausdiffundieren der Zellkomponenten und damit den Tod der Zelle. Die Hitzestabilität von Membranstrukturen soll daher ein entscheidendes Merkmal für thermophile Mikroorganismen sein. Diese Stabilität wird nach BROCK (1967a) durch eine starke Vernetzung der nach den Theorien 1.4.2 und 1.4.3 sowie so stabilen Membrankomponenten erreicht.

TANSEY & BROCK (1972) glauben mit dieser Theorie auch die Unfähigkeit von Eukaryonten, bei höheren Temperaturen als 60 C zu existieren, erklären zu können. Da Eukaryonten eine Reihe membranabgeschlossener Kompartimente besitzen (z.B. Kern, Mitochondrien), in die bestimmte Moleküle (hoch- und niedermolekular) hinein- und andere heraustransportiert werden müssen (z.B. RNA, Nucleotide), sollten die Membranen viele Poren haben, also ziemlich durchlässig und damit relativ locker aufgebaut sein. Die damit verbundene Flexibilität soll aber auf

Kosten der Stabilität gehen. Eukaryonten wäre es somit unmöglich, den inneren Permeationsmechanismus gleichzeitig thermostabil und funktionell zu gestalten.

Daß die thermophil-prokaryotische Zytoplasmamembran sehr hitzestabil zu sein scheint, deuten Protoplastenuntersuchungen von GOLOVACHEVA (1967) und BODMAN & WELKER (1969) an.

E S R-Untersuchungen an mesophilen und thermophilen Membranen eines fakultativ thermophilen Bacillus (CHAN et al. 1973) ergaben, daß die thermophile Zellmembran steifer und viskoser war als die mesophile. Als am stärksten vernetzte biologische Membran gilt bisher die Zellmembran von Thermoplasma acidophila (SMITH et al. 1973).

Über die Stabilität der Membrankomponenten ist oben schon berichtet worden. Widerspruch gegen die Membrantheorie wird von MITCHELL (1974) zitiert: Temperaturtoleranz sei keine einfache Funktion komplexer Zellstrukturen.

Was die Minimaltemperatur angeht, so ist nach der Membrantheorie die Zellmembran thermophiler Organismen wegen ihrer Vernetzung besonders bei den tieferen Temperaturen praktisch als impermeabel anzusehen (Begründung wie bei Lipidtheorie).

1.5 Zusammenfassung der beschriebenen Theorien und ihrer experimentellen Beweise

Problemstellung der vorliegenden Arbeit

Jede der vorgestellten Theorien hat Unterstützung und Widerspruch gefunden, und keine der Theorien ist unvereinbar mit einer der anderen. Der enge Zusammenhang von Lipid- und Membrantheorie ist ebenso einleuchtend wie der Zusammenhang von Membrantheorie und der Theorie der großen Hitzestabilität thermophiler Zellkomponenten: ein Schmelzen der Lipidverbände hätte den Verlust von Integrität und Funktion der prokaryotischen Membran zur Folge, die Denaturierung der Membranproteine zöge den fast vollständigen Stillstand der Stoff-

wechselprozesse nach sich, weil sich der Metabolismus zu großen Teilen an der Membran und ihren Proteinen abspielt.

Aber auch die dynamische Theorie läßt sich in die zellulären Vorgänge bei Hitzeeinwirkung integrieren: eventuelle Membran- oder andere Schädigungen könnten durch Reparatur oder Neusynthese der entsprechenden Komponenten behoben werden. Ein solches Reparatur- bzw. Synthesesystem wird wahrscheinlich in einer Zelle existieren, unbekannt bleibt allerdings das Ausmaß der Reparatur- bzw. Syntheserate, also die Leistungsfähigkeit dieses Systems. Die Theorie der makromolekularen Thermostabilität und die dynamische Theorie sind ebenfalls vereinbar: das Reparatur-/Synthesesystem der dynamischen Theorie muß ja, um funktionieren zu können, hitzestabil sein.

Das Überleben eines Organismus bei hohen Temperaturen dürfte somit auf der Wechselwirkung, dem Ineingreifen mehrerer Mechanismen und Faktoren beruhen: Zum einen auf relativ hitzestabilen Zellkomponenten (oder auf einigen wenigen, aber entscheidenden), also hitzeresistenten Proteinen, Lipidverbänden, Nukleinsäuren, Ribosomen und Membranen, zum anderen auf intensiven Stoffwechselvorgängen (gute Vermehrungsrate sowie bei hohen Temperaturen funktionierendes Reparatur-/Synthesesystem).

Nun haben die unter (1.4) erwähnten biochemischen Analysen der Hitzestabilität und -aktivität isolierter Zellkomponenten eine Reihe von Erkenntnissen über thermophile Mikroorganismen, genauer: über ihre molekularen Bestandteile, gebracht; sie waren und sind deshalb notwendig und nützlich. Dennoch haben sie zwei Nachteile: einmal den Nachteil der in vitro-Bedingungen, die normalerweise nicht identisch mit den in vivo-Bedingungen sind, weil man diese nicht kennt, zum anderen den Nachteil der Unsicherheit darüber, ob die untersuchte Komponente überhaupt lebensnotwendig für den Organismus ist oder nicht,

denn in der Regel sind die Stoffwechselwege bei thermophilen Mikroorganismen noch unbekannt.

Dieser Problemkreis (Analyse von Abbauwegen, Aufnahme und Ausnutzung von Nährstoffen, Wirkungsgrade, allgemeine Stoffwechselaktivitäten thermophiler Organismen in vivo) wird in der internationalen Literatur in der Grundlagenforschung nur vereinzelt aufgegriffen, z.B. bei HEINEN (1971) (*T. aquaticus*), bei ANDRESEN et al. (1973) und SCHULMAN et al. (1973) (*Clostridium thermoaceticum*), bei COULTATE & SUNDARAM (1975), JUNG et al. (1974) sowie HABERSTICH & ZUBER (1974) (*B. stearotherophilus*). Ansonsten finden sich - bis auf die Erstbeschreibungen neu entdeckter Organismen - hauptsächlich die rein biochemisch - analytisch oder morphologisch orientierten Arbeiten.

Es erschien daher interessant, an lebenden thermophilen Bakterienpopulationen neben Untersuchungen zum Wachstumsverhalten Fragen der Energie- und Kohlenstoffverwertung in Abhängigkeit verschiedener Parameter (Temperatur, pH, Nährstoffzusammensetzung und -konzentration, O_2 -Angebot) zu studieren, um so diese bei thermophilen Organismen noch recht unerforschten Zusammenhänge ein wenig zu durchleuchten. Die hierzu benutzten - physikalischen - Methoden waren die Kalorimetrie und die Photometrie. Speziell die Kalorimetrie ist bei thermophilen Organismen m.W. nur einmal angewendet worden, d.h. es liegen fast keine Daten über die Wärmeproduktion und Energiebilanzen von thermophilen Organismen beim Wachstum vor.

Fragen, die in dieser Arbeit untersucht werden, sind z.B.:

- 1) Wie verändert sich die Wachstumskinetik bei Variation verschiedener physikalisch-chemischer Parameter?
- 2) Wie ist die Effektivität des Nährstoffabbaus in Abhängigkeit dieser Parameter?
- 3) Wie ist die Kopplung zwischen energieliefernden und energieverbrauchenden Prozessen?

4) Wieviel der angebotenen Energie findet sich im Trockengewicht wieder?

5) Wieviel Wärme wird beim Wachstum produziert?

Darüber hinaus interessierte die Überlebensfähigkeit des Organismus bei Hitzeeinwirkung ohne Nährstoffangebot, sowie das eventuelle Freisetzen organischen Materials bei Hitzebehandlung.

Die gewonnenen Erkenntnisse werden dann mit den nach den Theorien zu erwartenden Effekten, soweit in der Tendenz vor-
aussehbar (Ertrag, Abtötungskinetik), verglichen. Weiterhin spielt der Vergleich der erhaltenen Resultate mit den Daten mesophiler Organismen eine besonders wichtige Rolle, weil etwaige Differenzen u.a. im thermophilen Charakter des Organismus begründet sein können.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Organismen (Charakterisierung und Aufbewahrung)

In dieser Arbeit wurden zwei thermophile Bakterienstämme untersucht:

1) *Thermus aquaticus*, der sowohl von der American Type Culture Collection bezogen (ATCC 25104) wie auch von T.D. BROCK freundlicherweise überlassen wurde (ausführliche Erstbeschreibung bei BROCK & FREEZE 1969).

2) *Bacillus stearothermophilus*, ein nicht archivierter Stamm, der als Agarplattenverunreinigung entdeckt, isoliert und angereichert wurde. Die Identifizierung dieses Organismus wurde von der National Collection of Industrial Bacteria (NCIB) durchgeführt.

Einige Eigenschaften der benutzten Bakterien sind in Tab. 3 wiedergegeben.

Tabelle 3: Eigenschaften der untersuchten Bakterien

	<i>T. aquaticus</i>	<i>B. stearothermophilus</i>
Form	Stäbchen	Stäbchen
Gram-Färbung	negativ	negativ
Beweglichkeit	unbeweglich	unbeweglich
Sporenbildung	nein	ja
Koloniefarbe	gelb	weißlich
O ₂ -Bedarf	obligat aerob	fakultativ aerob
T _{opt}	70 C	65 C
pH _{opt}	7.5 - 8	7.5 - 8
Generationszeit bei T _{opt}	50 min	20 min
Nährstoffbedarf	komplex	synthetisch

In ungeschüttelten Kulturen wächst *T.aquaticus* meist als Haut auf der Flüssigkeitsoberfläche, *B.stearothermophilus* zeigt relativ homogene Trübung mit leicht verstärkter Zellproduktion an der Grenzfläche zwischen Flüssigkeits- und Gasphase. Die Extraktion des Farbpigments aus der Membran von *T.aquaticus* mit Aceton lieferte ein Karotinoidabsorptionsspektrum (Abb. 3), wie es z.B. auch RAY et al. (1971b) und HEINEN et al. (1971) für *Thermus aquaticus* und OSHIMA & IMAHORI (1974) für *Thermus thermophilus* erhielten.

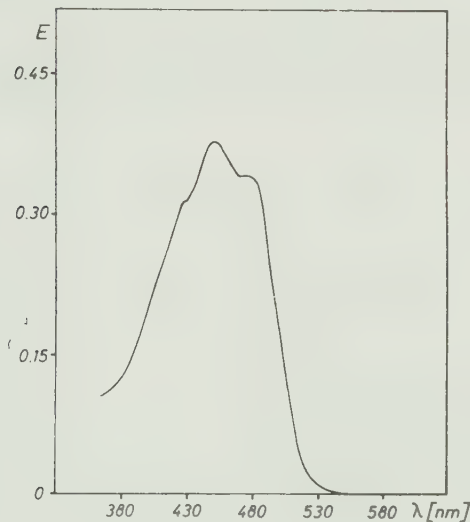


Abb. 3: Absorptionsspektrum des gelben Pigments von *T.aquaticus* (Karotinoidspektrum)

Die Stämme wurden auf Vollmedium - Schrägagar bei 4 C aufbewahrt und alle 3 - 4 Monate überimpft. Es hat sich aber gezeigt, daß die Organismen auch in Puffer ohne Veränderung in ihren biologischen Aktivitäten und Reaktionen bei 4 C über mehrere Monate hinweg zu halten sind.

2.2 Nährmedien und Puffer

Trotz intensiver Bemühungen ist es nicht gelungen, für *T.aquaticus* ein geeignetes Nährmedium zu finden, in dem Kohlenstoff-, Energie- und Stickstoffquelle eindeutig trennbar waren und in dem außerdem ohne Rühren oder Schütteln und Belüftung ein gutes und einigermaßen schnelles Wachstum erfolgte ("gut" bzgl. Ausbeute, "schnell" bzgl. Vermehrungsrate). Völlig unproblematisch in den Nährstoffansprüchen verhielt sich *B.stearothermophilus*, der in einem einfachen synthetischen Medium (Glucose + Ammoniumchlorid + Mineralsalze) gutes und schnelles Wachstum zeigte. Ein Wachstumsvergleich auf verschiedenen Substraten (Glucose, Pyruvat, Lactat, Acetat) lieferte eine eindeutige Präferenz von *B.stearothermophilus* für Glucose. Ohne Mineralsalze kann sich dieser Organismus nicht vermehren.

Medien

Sämtliche Medienbestandteile wurden in entmineralisiertem Wasser gelöst.

T.aquaticus:

Minimal - Komplexmedium (YYGM):

Yeast Extract (Difco) (YE) 0.1 %

Yeast Nitrogen Base with amino acids (Difco) (YNB) 0.1 %
Glucose 0.1 %, aber auch variabel

Bezeichnung der Medienzusammensetzung im Text für (z.B.)

0.1 % YE, 0.2 % YNB, 0.3 % Glucose: YYGM 0.1/0.2/0.3

Komplexmedium (CTYEM):

nach BROCK & FREEZE (1969) bestehend aus:

drei Teilen Castenholzsalzlösung (CS),

zwei Teilen Trypton/Yeast Extract (TYE) und

einem Teil H₂ O

a) CS (für 1l H₂ O):

Nitrilotriessigsäure	0.2 g
Ca SO ₄ · 2 H ₂ O	0.12 g
Mg SO ₄ · 7 H ₂ O	0.2 g
Na Cl	0.016 g
KNO ₃	0.21 g
Na NO ₃	1.4 g
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	0.556 g
Fe Cl ₃ (0.3 %)	0.2 ml
Nitsch's Spurenelemente	2 ml

Nitsch's Spurenelemente (für 1l H₂ O):

Mn SO ₄ · H ₂ O	2.2 g
Zn SO ₄ · 7 H ₂ O	0.5 g
H ₃ BO ₃	0.5 g
Cu SO ₄	0.016 g
Na ₂ Mo O ₄ · 2 H ₂ O	0.025 g
Co Cl ₂ · 6 H ₂ O	0.046 g
H ₂ SO ₄	0.5 ml

b) TYE (für 1l H₂ O):

Trypton	10 g
YE	10 g

Die Bezeichnungen z.B. CTYEM 0.3 bzw. TYE 0.3 bedeuten eine Trypton/Yeast Extract-Konzentration im Komplexmedium von 0.3 %.

Plattenmedium:

CTYEM 0.3 % + 2 % Agar

B. stearrowthermophilus:

Minimalmedium (NGCM):

N H₄ Cl 0.1 %, aber auch variabel

Glucose 0.1 %, aber auch variabel

CS 1 : 2 verdünnt

Bezeichnung der Medienzusammensetzung im Text für (z.B.):

0.1 % N H₄ Cl, 0.2 % Glucose : NGCM 0.1/0.2

Plattenmedium:

wie T. aquaticus

Puffer (für beide Organismen):

Tris/H Cl, pH 7.8 (für 2l)

12.12 g Tris- (hydroxymethyl)-aminomethan

1932.6 ml H₂ O

67.4 ml 1N H Cl

Die Medienbestandteile wurden 20 min lang bei 120 C getrennt autoklaviert und nach Erkalten so zusammengegeben, daß die gewünschten Konzentrationen erreicht wurden. Der pH der Medien wurde mit 1 N NaOH bei Raumtemperatur eingestellt. Wegen der Temperaturabhängigkeit des pH im alkalischen Bereich bedeutete dies, bei Zimmertemperatur einen pH-Wert einzustellen, der über dem bei der entsprechenden Wachstumstemperatur gewünschten pH (in der Regel 7.5 - 8, wenn nicht anders angegeben) lag. Einen Eindruck von der beachtlichen pH-Veränderung mit der Temperatur (bei alkalischem Anfangs-pH) gibt Abb. 4.

Die pH-Bedingungen im sauren Milieu sind offensichtlich temperaturunabhängig.

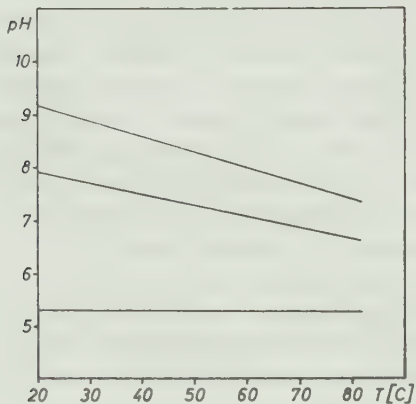


Abb. 4: Temperaturabhängigkeit des pH von NGCM 0.1/0.2 bei verschiedenem Anfangs-pH

2.3 Vorkulturbedingungen und Vorbereitungen für die Experimente

Der jeweilige benutzte Bakterienstamm wurde normalerweise vom Schrägagar abgeimpft und bei seiner Optimaltemperatur in Erlenmeyer-Nasenkolben im Wasserbad (geschüttelt oder ungeschüttelt), in Flaschen oder Reagenzgläsern mit luftdichtem Schraubverschluß (RGSV, Fa. Sovirel) im Brutschrank ohne Schütteln oder Belüften im entsprechenden Wachstumsmedium bis zur stationären Wachstumsphase angezogen. Danach wurden die Zellen bei 4800 Upm 15 - 20 min abzentrifugiert (Zentrifuge Typ I KS, Fa. Christ), 2x mit Tris/HCl - Puffer gewaschen und in Puffer aufgenommen. Nach einer Extinktionsmessung bei 525 nm

(Kolorimeter Modell J, Fa. Lange) wurde die so hergestellte Suspension in definierten Schritten bis zur gewünschten Beimpfungsextinktion verdünnt, so daß - über einen Eichfaktor (s. 2.5) - stets die Menge der eingeimpften Trockensubstanz bekannt war. Die Extinktion des Inokulates betrug bei *T.aquaticus* meist $\sim 4 \cdot 10^{-3}$, bei *B.stearothermophilus* $\sim 1.5 \cdot 10^{-3}$, nach der Beimpfung war die Konzentration der Trockensubstanz noch einmal 50-fach reduziert. Auf eine Auszählung des Zelltiters wurde verzichtet, da dieser für die durchgeführten energetischen und materiellen Bilanzierungen nur eine geringe Bedeutung haben dürfte - wenn überhaupt -, denn das Äquivalent der gespeicherten Energie bzw. des gespeicherten Kohlenstoffs ist die produzierte Trockenmasse und nicht die Zellzahl. Beide Größen sind wegen des variablen Zellvolumens nicht linear miteinander korreliert.

Bei den Hitzeinaktivierungskurven wurde allerdings über das Koloniebildungsvermögen die vermehrungsfähige Keimzahl zur Feststellung der Überlebensrate bestimmt. Dies war ja gerade die Zielsetzung dieser Versuche.

Eine große Anzahl von Experimenten wurde auch mit Zellen unternommen, die nach mehrmaligem Waschen schon längere Zeit bei 4 C in Puffer gehalten worden waren. Es zeigte sich anhand von Parallelansätzen, daß die Ergebnisse eines solchen Versuchs ohne Vorkultur mit denjenigen eines Versuchs mit Vorkultur übereinstimmten.

2.4 Wachstumsexperimente zur Energie- und Kohlenstoffverwertung

Bis auf die weiter unten erwähnten Thermomatenversuche und einige Nährstofftests für *T.aquaticus* in Erlenmeyerkolben im Wasserbad wurden sämtliche Experimente ohne kontinuierliches Rühren oder Schütteln und Belüften in luftdicht abgeschlossenen Gefäßen (Kalorimeterkammern, RGSV) durchgeführt. Rühren oder

Schütteln der verschlossenen Gefäße erhöhte zwar die Wachstumsgeschwindigkeit von *T.aquaticus*, aber nicht die Ausbeute, für *B.stearothermophilus* ergaben sich keine Unterschiede.

Wegen der bei hohen Temperaturen starken Verdampfung des Wassers und der damit verbundenen Veränderung der Nährstoffkonzentration war es notwendig, die Gefäße luftdicht abzuschließen, also auf Belüftung zu verzichten. Grundsätzlich ist zwar bei den außerhalb des Kalorimeters ausgeführten Serientests auch eine Versuchsdurchführung in verschlossenen Gefäßen mit O_2 -Zutritt in der wasserdampfgesättigten Atmosphäre eines Wasserbades möglich (und wurde auch einige Male zu Vergleichszwecken praktiziert), doch sollten diese Tests unter ähnlichen "batch"-Bedingungen wie im Kalorimeter ablaufen (bis auf das Verhältnis Oberfläche/Volumen direkt vergleichbar). Im Kalorimeter selbst hätten die Störsignale der Belüftungs- wie auch der Rührvorgänge die biologischen Effekte wegen der großen einzustellenden Empfindlichkeit völlig unterdrückt, ganz abgesehen von dem hier nicht abstellbaren Wasserverdampfungseffekt. Außerdem war durch diese Art der Versuchsführung die Herstellung schnell reproduzierbarer und für die Reihentests jeweils gleicher O_2 -Bedingungen gewährleistet (gleiche O_2 -Menge im Luftraum über der Mediumoberfläche bzw. gleicher O_2 -Anteil pro ml Luft).

Zu Anfang und Ende eines jeden Versuchs wurden Proben zur Feststellung des Glucoseverbrauchs entnommen, manchmal ergänzt um Proben für möglicherweise exkretierte Metaboliten (Pyruvat, Lactat, bei *B.stearothermophilus*). Außerdem wurden die Endextinktion als Äquivalent der Ausbeute am Kolorimeter und der End-pH bei Zimmertemperatur als Hinweis auf die Art der ausgeschiedenen Intermediärprodukte mit einem Labor-pH-Meter (Typ 71, Fa. Knick) gemessen.

Die Glucosebestimmung wurde mit der o-Toluidin-Methode durchgeführt. Die Tests auf die genannten Stoffwechselprodukte ver-

liefen insgesamt wenig erfolgreich, obgleich bei *B.stearothermophilus* stets ein geringer Lactatanteil im Medium nachzuweisen war. Die Testchemikalien stammten von der Fa. Boehringer Mannheim.

2.4.1 Photometrische Registrierung des Wachstums

Das Wachstum von Mikroorganismen folgt dem Ansatz eines sich autokatalytisch vermehrenden Systems:

$$dx = k \times dt,$$

d.h. die Zunahme dx der Organismendichte (Masse/Volumen) ist der vorhandenen Dichte x und dem Zeitintervall dt proportional. Der Proportionalitätsfaktor k ist die Geschwindigkeitskonstante des Wachstums. Unter "Wachstum" ist hier stets "Vermehrung" zu verstehen, nicht das Wachstum einer Zelle während ihres Zellzyklus. Durch Integration erhält man die Wachstumsgleichung von Mikroorganismen:

$$x = x_0 e^{kt}$$

woraus sich für die Verdopplungszeit t_d der Zellmasse bzw. -dichte ($x = 2x_0$), die in der exponentiellen Wachstumsphase des Organismus der Generationszeit t_g entspricht,

$$t_d = t_g = 0.693/k$$

ergibt. Wegen der Proportionalität von Extinktion und Zellmasse nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz läßt sich k (und damit t_d) aus einer halblogarithmischen Darstellung der Extinktion als Funktion der Zeit bestimmen. Aus der Endextinktion kann man über einen Eichfaktor (s. 2.5) die im Versuchsablauf produzierte Trockenmasse berechnen.

Mit Hilfe der bei verschiedenen Temperaturen erhaltenen Wachstumsraten k erhält man die Temperaturabhängigkeit des Wachstums im Arrheniusdiagramm (s. 1.2.2), aus dem die

Aktivierungsgrößen des Wachstums zu entnehmen sind. Die zu diesem Zweck von EYRING abgeleitete Form der Arrheniusgleichung lautet:

$$\log k = - \underbrace{\frac{\Delta H^+}{2.3 \cdot R}}_{\triangle A} \cdot \frac{1}{T} + \underbrace{\frac{\Delta S^+}{2.3 \cdot R} + \log \frac{k' \cdot T \cdot K}{h}}_{\triangle B}$$

in der ursprünglichen Arrheniusgleichung

wo ΔH^+ , ΔS^+ - Aktivierungsenergie bzw. -entropie
 R - allgemeine Gaskonstante
 T - absolute Temperatur
 k' - sog. Frequenzfaktor, der in den betrachteten Temperaturintervallen praktisch konstant ist
 K - Boltzmannkonstante, h - Plancksches Wirkungsquantum, K - Transmissionskoeffizient (Wahrscheinlichkeitsfaktor), meist = 1 gesetzt)

Zur Herleitung dieser Form der Arrheniusgleichung siehe z.B. LAMPRECHT (1969) oder CHRISTOPHERSEN (1973).

ΔH^+ wird aus der Steigung der Geraden, ΔS^+ aus dem Ordinateabschnitt berechnet. Die freie Aktivierungsenergie errechnet sich dann nach: $\Delta G^+ = \Delta H^+ - T \Delta S^+$
 Die photometrische Messung des Wachstums erfolgte auf zweierlei Art und Weise:

a) Thermomat (für Einzelmessungen):

In einer "Thermomat" genannten Anordnung (Thermostat mit Magnetrührer) wird die durch Zellvermehrung zunehmende Trübung in einer Glaskammer mit Schliffstopfen bei verschiedenen Wachstumstemperaturen mittels einer Fotozelle kontinuierlich von einem Schreiber aufgezeichnet. Dann erhält man die wegen Erschöpfung der Nahrungsquelle oder der Anhäufung von toxischen Stoffwechselprodukten typische sigmoide Wachstumskurve von Mikroorganismen.

Diese Versuche wurden für *T.aquaticus* in folgenden verschiedenen Medien durchgeführt: 1) CTYEM 0.3, 2) 0.5 % YE + 0.1 % Glucose, 3) 0.5 % YE + 0.1 % Pyruvat.

Für *B. stearothermophilus* wurde das Minimalmedium NGCM 0.1/0.2 verwendet.

b) Kolorimeter (für Reihentests):

Die Extinktionszunahme der sich in den luftdicht verschlossenen RGSV befindlichen Proben wird im Kolorimeter bei 525 nm zu bestimmten Zeiten nach kurzem Aufschütteln manuell gemessen. Daten der RGSV: Höhe ~ 16.3 cm, Durchmesser außen ~ 1.6 cm, Volumen ~ 18 ml.

In den Serientests wurden folgende Parameter variiert:

- 1) Sauerstoffangebot (variable Mediummenge)
 - 2) Glucosekonzentration (gleiche Mediummenge)
 - 3) Stickstoffkonzentration (gleiche Mediummenge)
 - 4) pH (gleiche Mediummenge, verschiedene Glucosekonzentrationen)
- (1) - (4) für verschiedene Wachstumstemperaturen
- (1) - (3) mit normalerweise alkalischem pH

Die Thermomatenmessung diente zur Berechnung der Wachstumsgeschwindigkeit und damit der Aktivierungsgrößen, die Serientests galten weniger dem speziellen Wachstumsverlauf als vielmehr der Bestimmung der Zellausbeute in Form des Energieäquivalents Trockensubstanz in Abhängigkeit von verschiedensten Parametern (pH, Temperatur, Glucosekonzentration, N_2 -Konzentration, O_2 -Bedingungen).

Alle Versuche wurden mehrfach wiederholt, um Zufallsergebnissen aufgrund der natürlichen biologischen Variationsbreite nicht ein zu starkes Gewicht zu verleihen.

2.4.2 Kalorimeterexperimente

In der Kalorimetrie nutzt man die Tatsache aus, daß bei fast allen physikalischen, chemischen und biologischen Prozessen entweder Wärme verbraucht oder aber abgegeben wird. Wenn man diesen Wärmeumsatz einer Reaktion durch geeignete empfindliche Nachweissysteme kontinuierlich über der Zeit aufzeichnet, erhält man ein Thermogramm, das sowohl die momentane Wärmeabgabe, den Wärmefluß, wie auch - durch Integration der resultierenden Kurve - den gesamten Wärmeaustausch (Aufnahme oder Produktion) abzulesen gestattet. Der Verlauf eines solchen Thermogramms läßt in vielen Fällen, vor allem nach Variation verschiedener Parameter, sehr weitgehende Rückschlüsse auf die Kinetik und den Wirkungsgrad der ablaufenden Prozesse zu.

Historische Entwicklung, Aufbau, Wirkungsweise und Einsatzmöglichkeiten verschiedener Kalorimeterausführungen sind z.B. den ausführlichen Darstellungen von ROTH & BECKER (1956), LAMPRECHT (1969), BOIVINET (1971), FORREST (1972) und LAMPRECHT & SCHAARSCHMIDT (1974) zu entnehmen.

In dieser Arbeit wurde zur Messung der im Verlauf des Bakterienwachstums entstehenden Wärme ein isothermes Differential - Mikrokalorimeter nach Calvet (MS 70, Fa. Setaram) mit zwei Kammern verwendet. Allgemeine Beschreibungen eines Kalorimeters vom Typ Calvet sind bei CALVET (1962), CALVET & PRAT (1956), BOIVINET (1964) und LAMPRECHT (1969) zu finden.

Dieses Gerät ermöglicht eine Differenzmessung der Thermospannungen, die an den an beiden Kalorimeterkammern in thermisch engem Kontakt anliegenden gleichartigen Thermoäulen bei einer reaktionsbedingten Temperaturveränderung im Meßsystem entstehen. Dadurch ergibt sich eine von äußeren Einflüssen praktisch störungsfreie Registrierung des resultierenden Wärmeflusses der ablaufenden Reaktionen, denn eine Kammer dient stets als Referenzkammer ohne Reaktionsvorgang zur Kompensation von Einwirkungen etwaiger Veränderungen von

Umgebungsparametern (Temperatur-, Druck-, Feuchtigkeitsschwankungen).

Die Einstellung der gewünschten Arbeitstemperatur erfolgte mit dem Temperatursteuergerät RT 3000 R (Fa. Setaram), die Differenzspannung als Maß der zeitlichen Wärmeproduktion wurde von dem Kompensationsschreiber Mikrograph BD 5 (Fa. Kipp & Zonen) mit automatischer Nullpunktsunterdrückung, einem Empfindlichkeitsbereich von 0.1 V bis 20 μV sowie einem Vorschubbereich von 100 bis 0.1 mm/min aufgezeichnet. In praxi wurde stets mit einem Vorschub von 0.1 mm/min, der großen Thermosäule (s. Tab. 4) und Empfindlichkeitsstellungen des Schreibers von 0.5, 0.2 und 0.1 mV gearbeitet. Die Eichung des Gerätes hat SCHAARSCHMIDT(1972) mit Hilfe des Joule-Effekts durchgeführt. Tab. 4 gibt einige Daten des benutzten Mikrokalorimeters wieder (nach SCHAARSCHMIDT 1972).

Tabelle 4: Technische Daten des Mikrokalorimeters MS 70

Thermosäulen (Chromel-Konstantan)	Anzahl Thermoelemente	Empfindlichkeit
große Säule	1316	56.3 $\mu\text{V}/\text{mW}$
mittlere Säule	987	42.4 $\mu\text{V}/\text{mW}$
kleine Säule	329	14.3 $\mu\text{V}/\text{mW}$

Die verwendeten Kalorimeterkammern bestanden aus V2A-Stahl mit 1 mm Wandstärke, 100 ml Volumen, 35 mm Durchmesser und 120 mm Höhe. Sie können mit einem Stahldeckel mit Gummidichtungsring luftdicht zugeschraubt werden, auf den noch ein Gestänge zum problemlosen Einführen der Kammern in das Kalorimeter aufgeschraubt werden kann. In der Referenzkammer befindet sich zwecks Herstellung dergleichen Wärmekapazität immer die dem Mediumvolumen der Reaktionskammer entsprechende Menge an

m/20 KH_2PO_4 -Puffer. Kammer und Kammerdeckel wurden vor Versuchsbeginn 20 min bei 123 C autoklaviert bzw. meistens mehrere Stunden lang im Sterilisationsschrank bei 180 C gehalten.

Nach dem Einfüllen des vorher beimpften Mediums in die Reaktionskammer (meist 20 ml) und dergleichen Puffermenge in die Referenzkammer wurden die Kammern fest verschraubt und in einem Wasserbad 10 min auf die gewünschte Versuchstemperatur vortemperierte, um nach dem Einführen ins Kalorimeter den Temperatúrausgleich zwischen Kammern und Thermostatenblock des Kalorimeters zu beschleunigen. Da beim Einführen der Kammern ins Kalorimeter stets Reibungswärme auftritt, ist darauf zu achten, daß die Beimpfung des Mediums so gewählt wird, daß der in der anfänglichen lag-Phase des Bakterienwachstums auftretende Wärme fluß unterhalb der Nachweisempfindlichkeit der Apparatur bleibt, solange die Abklingphase der Reibungswärme noch nicht beendet ist.

Für Versuche unter Stickstoffatmosphäre zur Herstellung anaerober Wachstumsverhältnisse wurde ein spezieller Deckelverschluß mit Gaseinfüll- und auslaßventil benutzt (Swagelok tube fitting, Fa. Crawford). Die N_2 -Atmosphäre wurde durch 15minütiges Durchblasen der Reaktionskammer mit N_2 bei 3 atü Druck realisiert. Der im Medium befindliche Sauerstoff ist hierdurch sicher nicht völlig herauszutreiben, dennoch sind die hierfür notwendigen Korrekturen bei den entsprechenden Fragestellungen vernachlässigbar, wie Testansätze mit N_2 -durchperltem Medium (15 min lang vor Einführen ins Kalorimeter) gezeigt haben.

Nach Versuchsende (Rückkehr des Ausschlags auf die Nulllinie wegen Substrat-, Sauerstoff- oder Stickstoffmangel oder der Anhäufung toxischer Stoffwechselprodukte) wurden die oben erwähnten Bestimmungen (Glucose, Endextinktion, End - pH) durchgeführt. Die Extinktion wurde in 1 cm Rundküvetten im Kolorimeter bei 525 nm gegen H_2O gemessen. Die Flächen der

erhaltenen Thermogramme wurden mit einem Polarplanimeter ausplanimetriert und mittels Vorschub- und Empfindlichkeitsdaten in die Gesamtwärmeproduktion beim Organismenwachstum umgerechnet.

Mit Hilfe eines Integrimeters kann man darüber hinaus den zeitlichen Verlauf der gesamten abgegebenen Wärme (durch Integration über die einzelnen aufeinanderfolgenden Wärmeflüsse) bestimmen.

2.5 Umrechnungsfaktoren zur Auswertung der unter (2.4) angefallenen Daten

Für die Aufstellung von energetischen und materiellen Bilanzen zur Berechnung der Effizienz des Baustoffwechsels besteht die Notwendigkeit, den Glucoseverbrauch während des Wachstums mit der produzierten Wärme, dem gebildeten Trockengewicht und eventuell ausgeschiedenen Stoffwechselprodukten zu korrelieren. Letztere sind zwar mit Sicherheit bei *B.stearothermophilus* vorhanden, es ist aber nicht gelungen, sie chemisch zu identifizieren. Allerdings legt der Identifikationstest von der NCIB nahe, als einen möglichen Metaboliten Acetoin anzunehmen (Voges-Proskauer-Reaktion positiv). Lactat ist - wie erwähnt - in geringen Mengen ebenfalls stets vorhanden.

Die Bestimmung des Glucoseverbrauchs und der abgegebenen Wärme wurde bereits unter (2.4) beschrieben. Es bleibt die Frage nach der Ausbeute durch den Abbau der Energie- und Kohlenstoffquelle und dem Energiegehalt der produzierten Trockensubstanz. Für die Ausbeutenbestimmung braucht man eine Umrechnung von Extinktionseinheiten in Trockengewichtswerte pro Volumeneinheit, für die Bestimmung des Energiegehalts der Trockenmasse bietet sich die Verbrennungskalorimetrie an.

2.5.1 Zusammenhang von Trockengewicht pro Volumeneinheit und Extinktion

Bei verschiedenen Wachstumstemperaturen wurde der jeweilige Bakterienstamm bei optimalem pH in den Medien 0.5 % YE + 0.1 % Glucose (*T.aquaticus*) und NGCM 0.1/0.5 (*B.stearothermophilus*) in 500 ml - oder 1l-Flaschen mit Schraubverschluß bis zur stationären Phase angezogen, abzentrifugiert und gewaschen, wie bereits beschrieben. Nach dem dritten Zentrifugationsdurchgang wurde ca. die Hälfte des Niederschlags für die Verbrennungskalorimetrie zurückbehalten, der Rest in einem Meßkölbchen in definierter Puffermenge aufgenommen (meist 50 ml). Von dieser "Stammlösung" wurde eine Verdünnungsreihe von 1:1 bis 1:20 angesetzt, die Extinktionswerte der einzelnen Verdünnungen wurden im Kolorimeter in Rundküvetten gemessen und gegen die Verdünnung aufgetragen (s. Abb. 5).

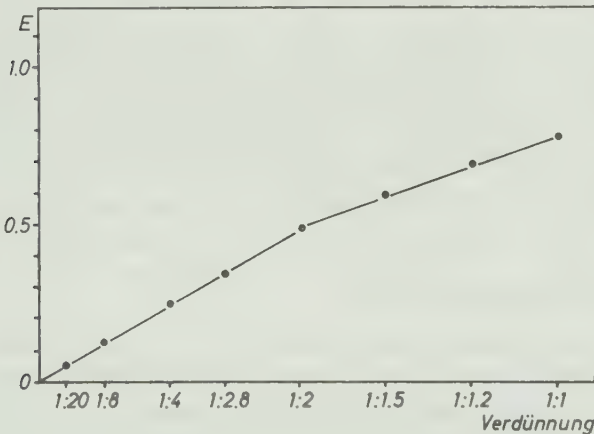


Abb. 5: Extinktionswerte E in Abhängigkeit von der Verdünnung der Stammlösung (*T.aquaticus*)

Man entnimmt der Abb. 5, daß das Lambert-Beer'sche Gesetz nur bis zu Extinktionen von 0.4 - 0.5 Gültigkeit besitzt. Aus dem Anfangs-linearen Teil der erhaltenen Kurven (also aus den größeren Verdünnungen) ergibt sich der für die Berechnung

später einzusetzende Extinktionswert der Stammlösung durch Multiplikation der Extinktion der entsprechenden verdünnten Probe mit dem zugehörigen Verdünnungsfaktor.

Der nicht für die Verdünnungsreihe benötigte Teil der Stammlösung im Meßkölbchen wurde in definierten Mengen über Membranfilter der Porengröße 0.1μ (Fa. Sartorius) mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die Filter wurden dann im Brutschrank bei 70°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Als Kontrolle wurde stets ein Filter mit angesetzt, der nur mit Puffer behandelt worden war. Durch die anschließende Wägung der getrockneten Filter ergibt sich die pro Volumeneinheit vorhandene Trockenmasse der Stammlösung, der nun der - wie oben erwähnt - berechnete Extinktionswert der unverdünnten Stammlösung zugeordnet werden kann. Dadurch erhält man das Trockengewicht pro Volumeneinheit, das einer bestimmten Extinktion entspricht. Hier wurde das Trockengewicht/Volumen auf eine Extinktionseinheit von $0.01 \Delta E$ bezogen, so daß bei Versuchsende der Wachstumsexperimente, d.h. für die stationäre Phase, nach der Endextinktionsmessung angegeben werden kann, wieviel g TG/ml im Verlauf des Organismenwachstums und nach Multiplikation mit der eingesetzten Mediummenge auch wieviel Gesamttrockensubstanz entstanden ist.

2.5.2 Verbrennungskalorimetrie

Der unter (2.5.1) erwähnte zurückbehaltene Teil der bei verschiedenen Temperaturen aufgewachsenen Bakterienzellen wurde im Lyophilisator gefriergetrocknet, anschließend homogenisiert, in einer Pillenpresse zu Pillen von 10 - 25 mg Masse gepreßt, die in einer umgebauten Mikrobombe nach PHILLIPSON (1964) in reiner O_2 -Atmosphäre (25 atü) durch eine Kondensatorentladung über einen Platindraht im Kalorimeter gezündet und verbrannt wurden. Der Verbrennungsvorgang wurde vom Kompensationsschreiber Micrograph kontinuierlich registriert und der erhaltene Kurvenverlauf mit Hilfe von Eichfaktoren, die man durch die Verbrennung von Benzoesäurepillen erhält, deren Verbrennungs-

wärmen bekannt sind, ausgewertet. Auf diese Weise kann der Energiegehalt einer Trockengewichtseinheit (1 g oder 1 mg) bestimmt werden.

2.6 Experimente zur Hitzeresistenz

Das Ziel dieser Versuche war es, festzustellen, ob thermophile Organismen ohne Nährstoffangebot bei ihren normalen Wachstumstemperaturen für längere Zeit existieren können, und wenn nicht, ob durch Mineralsalz- und/oder Glucosezugabe die Abtötung zu verhindern oder herabzusetzen ist. Weiterhin interessierten die Abtötungskinetik und die Art der Zellschädigung: resultiert der Tod einer Zelle aus der Inaktivierung intrazellulärer Makromoleküle oder lassen sich Rückschlüsse auf strukturelle Veränderungen der Zellmembran und Zellwand ziehen.

Die Hitzeresistenz der Bakterien wurde einmal durch Plattenversuche zur Bestimmung der Überlebendenzahl nach bestimmten Zeiten der Hitzebehandlung überprüft, also in einer Art "Dosiseffektkurve" mit der Behandlungstemperatur als variablem Parameter, zum andern durch den Austritt organischen Materials aus den Zellen nach Hitzebehandlung, was durch eine Absorptionsmessung im Beckmann Spektralphotometer bei 260 nm oder 280 nm realisierbar ist.

2.6.1 Absterbekinetiken

Bei der optimalen Wachstumstemperatur bis zur stationären Phase aufgewachsene Zellen wurden nach den üblichen Waschprozeduren in Puffer aufgenommen, auf eine Extinktion von 0.3 (525 nm) eingestellt und je 5 ml in RGSV verschiedenen Temperaturen ausgesetzt. Zu bestimmten Zeiten wurden Proben entnommen, verdünnt und auf je zwei CTYEM-Platten ausgespatelt.

Die Platten wurden zur Vermeidung der Wasserverdampfung in feuchtes Kleenexpapier, danach in Alu-Folie eingeschlagen und 1 - 2 Tage bei der Optimaltemperatur im Brutschrank bebrütet. Anschließend wurden die Kolonien gezählt, die ein Maß für die Überlebensrate der vermehrungsfähigen Bakterienzellen darstellen und mit einer Kontrollprobe (ohne Hitzebehandlung bei Zimmertemperatur) verglichen.

In einigen Fällen wurde der Tris/HCl-Puffer mit 0.1 % Glucose versetzt, um eventuelle Schutz- oder Stabilisierungseinflüsse eines Substrates zu analysieren.

Mit der gleichen Methode wurde auch die Hitzeresistenz in Abhängigkeit von der Wachstumstemperatur untersucht.

2.6.2 Leakage (Freisetzung organischen Materials)

Die Herstellung der Zellsuspensionen und die Temperaturbehandlung erfolgten wie unter (2.6.1). Nach 1h oder 2h wurden die Zellen bei 4800 Upm in der Christ-Zentrifuge sedimentiert und der Überstand im Spektralphotometer bei 260 - 280 nm gemessen, um festzustellen, inwieweit Zellwand und -membran durch die Hitzeeinwirkung beschädigt worden sind. Falls "Löcher" auftreten, sollte das organische Material (Nukleinsäuren, Proteine, niedermolekulare Bestandteile) aus der Zelle herausdiffundieren und durch eine Absorptionsmessung im genannten Wellenlängenbereich nachzuweisen sein.

Die Zellsuspensionen wurden diesbezüglich auch in einem salzhaltigen Milieu getestet.

3. ERGEBNISSE

3.1 Nährstofftests für *Thermus aquaticus* bei der Optimaltemperatur

Für Plattenversuche zur Bestimmung der vermehrungsfähigen Keimzahl gilt es, ein optimales Nährmedium zu benutzen, bei dem die genaue Kenntnis der Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequelle nicht so wichtig ist, das aber die Wachstumsansprüche des Organismus voll erfüllt und damit eine schnelle und unbehinderte Vermehrung gestattet. Als ein solches Medium hat sich das von BROCK & FREEZE (1969) vorgeschlagene Komplexmedium CTYEM mit 0.3 % TYE erwiesen, was anhand des Wachstums von *T.aquaticus* als Flüssigkultur bei 70 C im Schüttelwasserbad bei verschiedenen TYE-Konzentrationen demonstriert werden kann (Abb. 6).

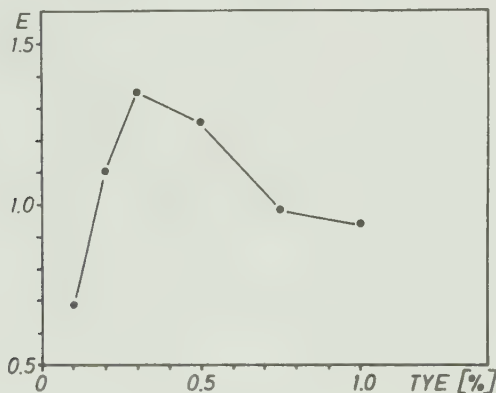


Abb. 6: Endextinktion E des Wachstums von *T.aquaticus* als Funktion der TYE-Konzentration (70 C)

Für die Aufstellung von energetischen und materiellen Ertragsbilanzen ist es dagegen immer wünschenswert, mit definierter Energie-, Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zu arbeiten.

Deshalb wurde bei *T.aquaticus* zunächst versucht, das Komplexmedium CTYEM "weniger komplex" zusammenzusetzen, um hierdurch schon vielleicht eine Trennung in Energie-, Kohlenstoff- und Stickstofflieferant vornehmen zu können. Dazu wurden bei variablen YE - Konzentrationen (0 - 1.5 %) Pyruvat, Glucose und Acetat (0 - 1.5 %) als Substrate getestet und auf Trypton wurde ganz verzichtet. Parallelansätze ergaben, daß im Flüssigmedium bei Verwendung von YE oberhalb 0.3 - 0.5 % die Castenholzsalzlösung ohne Verringerung der Ausbeute und Wachstumsrate im Vergleich zu CTYEM 0.3 entbehrlich war. Gutes Wachstum ohne Mineralsalze ereignete sich aber auch bei kleineren YE-Konzentrationen.

Insgesamt zeigte sich, daß bei höheren YE-Konzentrationen (≥ 0.3 %) zwar gutes und schnelles Wachstum auch ohne Schütteln stattfand, daß aber der Einfluß der zugegebenen C - und/oder Energiequelle nur schwach oder sogar gar nicht zu erfassen war (maximal 20 % - 30 % Ausbeutenverbesserung durch Glucosezugabe gegenüber den entsprechenden reinen YE-Medien, 30 % - 40 % bei Pyruvatzugabe).

Andererseits inhibierten höhere Substratkonzentrationen das Wachstum eindeutig (unterschiedlich je nach C-Quelle: Glucose bereits oberhalb 0.2 %, Pyruvat erst oberhalb 0.5 %).

Weiterhin ergaben sich zwischen den einzelnen Substraten bei den günstigsten Konzentrationen (0.3 % Pyruvat, 0.1 % Glucose) keine wesentlichen Wachstumsdifferenzen bzgl. Geschwindigkeit und Ausbeute, obschon eine Präferenz für Pyruvat zu verzeichnen ist.

Die Ergebnisse zusammengekommen ergaben, daß die beschriebenen Medien die gestellten Anforderungen nicht erfüllten, so daß eine andere, von HEINEN (1971) für *T.aquaticus* angegebene Medienzusammensetzung (allerdings mit einer etwas anderen als der von HEINEN benutzten Salzlösung, nämlich mit der Castenholzsalzlösung) ausprobiert wurde. HEINEN (1971) gibt an, daß in einem Basalmedium, bestehend aus 0.2 % Brain Heart Infusion (BHI) und Mineralsalzen, Wachstum von *T.aquaticus* erst nach

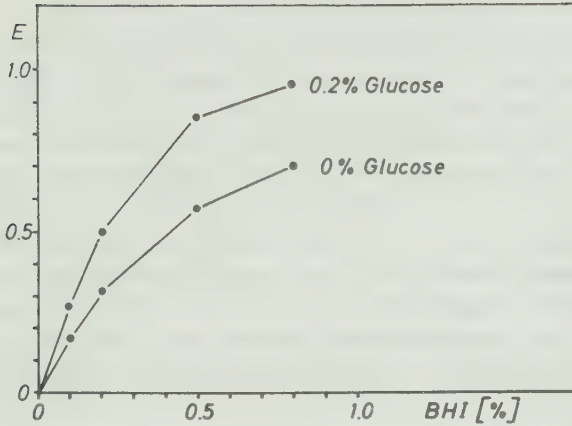


Abb. 7: Endextinktion E des *T. aquaticus*-Wachstums als Funktion der BHI-Konzentration mit und ohne Glucosezusatz (70 °C)

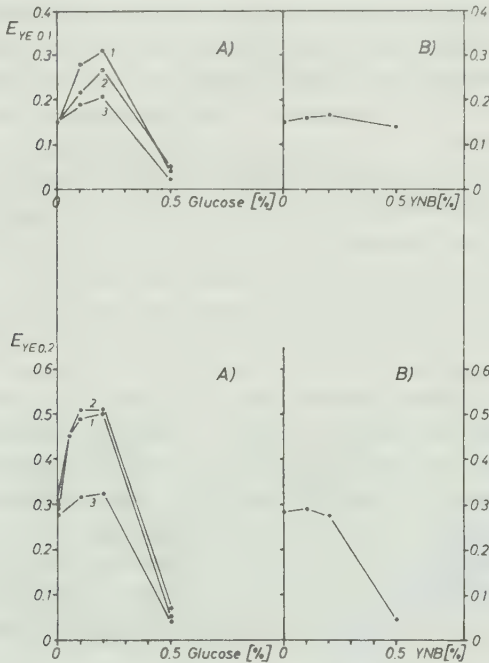


Abb. 8: Endextinktion des *T. aquaticus*-Wachstums als Funktion von Glucose - und YNB -Konzentration für 0.1 % YE (oben) und 0.2 % YE (unten); Temperatur: 70 °C
A) 1- 0.1 % YNB, 2-0.2 % YNB, 3-0.5 % YNB
B) ohne Glucose

Zugabe bestimmter Substrate, z.B. 0.2 % Glucose, zu beobachten sei.

Wie Abb. 7 aber zeigt, trifft dies für eigene Versuchsansätze nicht zu, darüber hinaus ist der Glucoseeffekt wiederum recht schwach. Die Mineralsalze waren im übrigen für das Wachstum auch in diesem Fall prinzipiell nicht erforderlich.

Die nächsten getesteten Medien waren rein synthetische Medienkombinationen, wie sie z.B. bei BROCK & FREEZE (1969) erwähnt werden und dort Wachstum veranlassten. Hier wurden, jeweils in verschiedenen Konzentrationen und Zusammensetzungen Glutaminsäure, Glucose, Pyruvat, Acetat, Ammoniumchlorid, YNB mit und ohne Aminosäuren, die drei Aminosäuren Histidin, Methionin und Tryptophan sowie einige andere Aminosäuren plus jeweils die Castenholzsalzlösung (ohne Rühren oder Schütteln) überprüft. In einigen Fällen (z.B. Glutaminsäure/Glucose/YNB mit Aminosäure oder reine Glutaminsäure von 0.2 - 0.5 %) war mäßiges bis recht gutes Wachstum hinsichtlich der Ausbeute, aber schlechtes Wachstum bzgl. der Wachstumsgeschwindigkeit zu beobachten, bei den meisten Medienkombinationen wuchs der Organismus aber überhaupt nicht, so daß auch diese Medien nicht den Ansprüchen gerecht wurden. Der Grund hierfür mag zum großen Teil an fehlender Belüftung bzw. fehlendem Schütteln gelegen haben. Aus einer Nährstofftabelle für *T.aquaticus* von JACKSON et al. (1973) geht allerdings ebenfalls hervor, daß in den synthetischen Medien nach BROCK & FREEZE (1969) *T.aquaticus*-Wachstumsversuche erfolglos blieben.

Wegen der oben genannten Mißerfolge in vielerlei Medien wurde schließlich versucht, in einem Medium mit geringem Komplexbestandteil und ansonsten synthetischer Zusammensetzung ohne Rühren oder Schütteln und Belüften einigermaßen gutes und schnelles Wachstum zu erreichen. Dazu wurden YE-Konzentrationen von 0.1 % und 0.2 % gewählt sowie variable Konzentrationen an Glucose (0 - 0.5 %) und YNB mit Aminosäuren (0 - 0.5 %). Es zeigte sich, daß Glucose und YNB-Kon-

zentrationen von 0.1 % bzw. 0.2 % die besten Ergebnisse lieferten, und zwar gelang ungefähr eine Ausbeutenverdopplung nach Glucosezugabe entsprechender Konzentration gegenüber dem gleichen Medium ohne Glucose. Da die Generationszeit in diesen Medien gegenüber den Optimalbedingungen nicht zu groß (50 min $\longrightarrow$ 100 min) und die Ausbeute zufriedenstellend war, wurde ein Medium aus 0.1 % YE, 0.1 % YNB und 0.1 % bzw. 0.2 % Glucose als optimales Minimalkomplexmedium angesehen, das noch etwas günstigere Ergebnisse brachte als die Medien mit 0.2 % YE (bzgl. Ausbeutensteigerung mit Glucose gegenüber dem Medium ohne Glucose).

In Abb. 8 sind einige der Resultate - die Endextinktion - in Abhängigkeit von YE-, Glucose- und YNB-Konzentration aufgetragen.

In einigen Fällen, in denen die Frage nach Energie- und Materialbilanzierung in absoluten Werten nicht interessierte (z.B. Thermomatversuche, orientierende O_2 -Bedarfs-Versuche), wurde aber auch mit den komplexen Medien CTYEM 0.3 % und YE 0.5 %/Glucose 0.1 % bzw. Pyruvat 0.1 % gearbeitet.

3.2 Trübungsmessungen am Thermomat

3.2.1 Thermus aquaticus

Mit einer Trübungsmessung in der Thermomatenanordnung erfaßt man den individuellen Wachstumsverlauf des Organismus mit lag-, log- und stationärer Phase, d.h. die typische sigmoide Wachstumskinetik (Abb. 9). Aus dem exponentiellen Teil der Wachstumskurve kann man die Wachstumsrate (Geschwindigkeitskonstante k) und damit (s. 2.4.1) die Generationszeit berechnen. Dies wurde für die verschiedensten Wachstumstemperaturen im Bereich 45 - 82 C und für pH-Einstellungen im Bereich 5.5 - 10 bei einigen Temperaturen durchgeführt.

Als Optimaltemperatur bezüglich der Vermehrung wurde für *T. aquaticus* in 3 verschiedenen Medien (CTYEM 0.3, YE 0.5/Glu-

cose 0.1, YE 0.5/Pyruvat 0.1) etwa 70 C ermittelt (wie auch von BROCK & FREEZE 1969 angegeben), mit einer Generationszeit von rund 50 min. Wachstum erfolgte im Temperaturbereich 45 - 82 C. Dabei war die Maximaltemperatur medienabhängig: in der Kombination YE/Pyruvat wird die höchste (82 C), in YE/Glucose die niedrigste Maximaltemperatur (78 C) erreicht. Ähnliche Resultate erhielt HEINEN (1971).

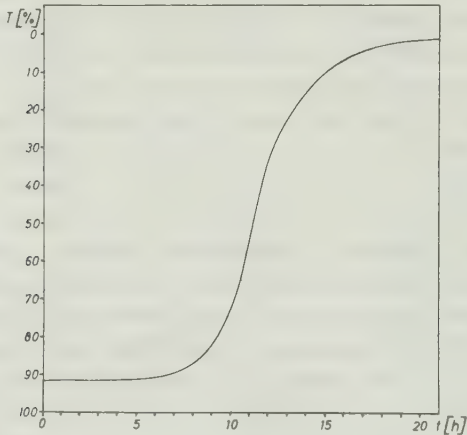


Abb. 9: Thermomatenwachstumskurve *T. aquaticus*:
Transmission $T = f$ (Zeit t)

Die Generationszeiten steigen in Richtung der beiden Grenztemperaturen beachtlich an. Sowohl im Bereich der Minimal- als auch der Maximaltemperatur vergehen 3 - 4 h und mehr bis zur nächsten Zellteilung.

Innerhalb des pH-Bereichs von 6 - 9.3 ist Wachstum möglich, bzgl. der Vermehrungsgeschwindigkeit optimale pH-Werte liegen zwischen 7.3 und 8.2. Die starke Veränderung der Wachstumsgeschwindigkeit bei der Optimaltemperatur (70 C) mit dem pH zeigt Abb. 10.

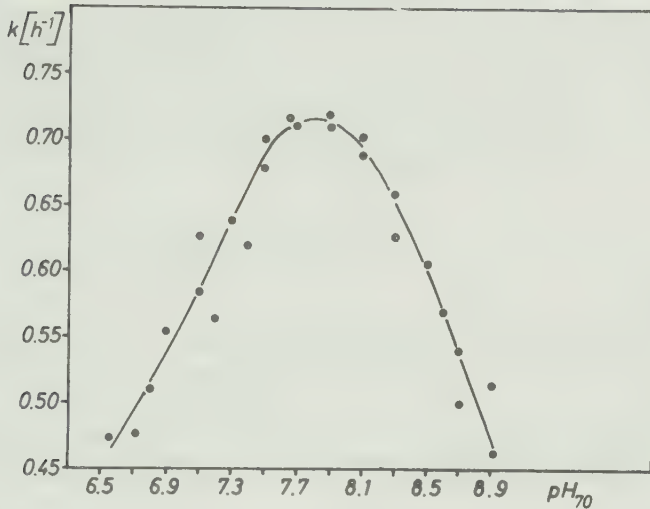


Abb. 10: Wachstumsraten k von *T. aquaticus* bei 70 C in Abhängigkeit des Anfangs- pH_{70}

Die Auftragung des dekadischen Logarithmus der Wachstumsrate gegen die reziproke Temperatur liefert das Arrheniusdiagramm. Von den niedrigeren Wachstumstemperaturen (50 C) bis zur Optimaltemperatur erhält man für alle drei Medien einen linearen Abfall von $\log k$ mit $1/T$, was einer Verringerung der Generationszeit bis zu einem Minimum bei T_{opt} entspricht. Oberhalb der Optimaltemperatur fallen die $\log k$ - Werte schnell ab.

In Abb. 11 ist der Arrheniusplot für YE 0.5/Glucose 0.1 zu sehen. Aus dem linearen Anstieg des Kurvenverlaufs lassen sich die zugehörigen Aktivierungsgrößen berechnen. Diese sind bis auf ΔG^+ , die freie Aktivierungsenthalpie, medienabhängig.

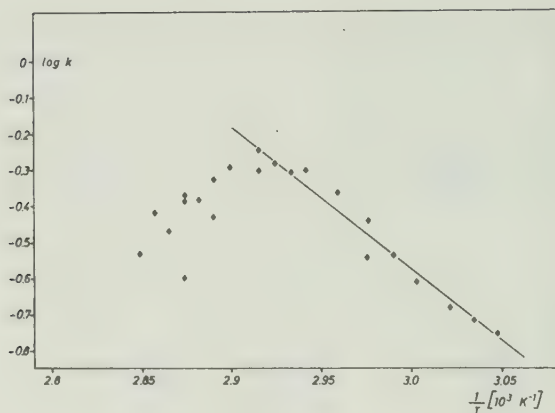


Abb. 11: Arrheniusplot des Wachstums von *T. aquaticus* in YE 0.5/Glucose 0.1

Tabelle 5 gibt die für die 3 Medien berechneten Aktivierungsgrößen für *T. aquaticus* sowie die mathematische Beschreibung (nach Regressionsanalyse) von $\log k$ als Funktion von $1/T$ im linearen Teil.

Tabelle 5: Aktivierungsgrößen des Wachstums von *Thermus aquaticus* in drei verschiedenen Medien und mathematische Formulierung des linearen Kurven- teils im Arrheniusplot

	CTYEM 0.3	YE 0.5/ Glucose 0.1	YE 0.5/ Pyruvat 0.1
ΔH^+ (kJ/Mol)	77.4	74.9	66.5
ΔG^+ (kJ/Mol)	109.2	109.6	109.6
ΔS^+ (J/K.Mol)	- 92.5	- 102.5	- 125.5
$\log k =$	$-4.03 \cdot 10^3 \cdot 1/T$ + 11.54	$-3.88 \cdot 10^3 \cdot 1/T$ + 11.06	$-3.45 \cdot 10^3 \cdot 1/T$ + 9.86

Aufnahmen des *T. aquaticus*-Wachstums in dem den Kalorimeterexperimenten und den Reihentests entsprechenden Medium YYGM 0.1/0.1/0.1 ergaben wie erwartet eine Vergrößerung der Generationszeit bei T_{opt} von 50 auf 100 min und eine kleinere Endextinktion, d.h. einen geringeren Gesamtertrag. Für dieses Medium wurden keine Aktivierungsgrößen berechnet.

3.2.2 Bacillus stearothermophilus

Die Trübungskurven von *B. stearothermophilus* in NGCM 0.1/0.2 zeigen keine prinzipiellen Unterschiede zu denjenigen von *T. aquaticus* (sigmoide Wachstumskinetik etc.). Als Temperaturbereich für das Wachstum wurde 45 - 72 C, als möglicher pH-Bereich 5.2 - 9.3 ermittelt. Die Optimalbedingungen für die Vermehrungsgeschwindigkeit sind $T = 65$ C und pH von 7.5 - 8.

Die Generationszeit verändert sich von ~ 100 min (bei 50 C) über 51 min (55 C), 30 min (60 C), 25 min (63 C) bis zu 20 min bei 65 C, um dann bis 72 C wieder auf ~ 80 min anzusteigen. Läßt man die Zellen mehrere Stunden im Nährmedium oberhalb T_{max} , so erfolgt kein Wachstum. Senkt man dann aber die Temperatur auf Werte unterhalb T_{max} , so setzt die Zellvermehrung nach einer lag-Phase mit der für die Shifttemperatur typischen Wachstumsrate wieder ein. Bei Temperaturverschiebungen innerhalb des Bereichs (T_{min} , T_{max}) wird unmittelbar die Wachstumsrate der neuen Temperatur angenommen.

3.3 Trockengewicht und Extinktion

Die Abb. 12 gibt die Bakteriendichteverteilung pro Extinktionseinheit von 0.01 ΔE von *T. aquaticus* und *B. stearothermophilus* über den gesamten Temperaturbereich, in dem die Bakterien wachsen, wieder. Der Kurvenverlauf ist in beiden Fällen ähnlich:

bei den oberen und unteren Grenztemperaturen wird eine Extinktionsänderung um $0.01 \Delta E$ erst mit größeren Mengen an Trockensubstanz pro Volumeneinheit erreicht als im Bereich 60 - 65 C. Anders ausgedrückt: eine gleichgroße Trockensubstanzproduktion pro ml Medium bei allen Temperaturen ruft bei 65 C die stärkste Extinktionszunahme hervor.

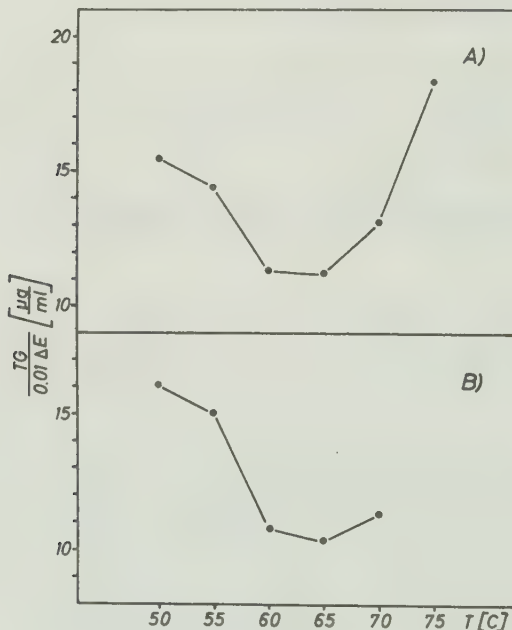


Abb. 12: Temperaturabhängigkeit der Bakteriendichteverteilung pro Extinktionseinheit von *T. aquaticus* (A) und *B. stearothermophilus* (B)

In Tabelle 6 ist für beide Organismen aufgeführt, wieviel mehr gegenüber 65 C an Trockengewicht bei den anderen Wachstumstemperaturen gebildet werden muß, um den gleichen Extinktionswert wie 65 C zu liefern. Dabei ist der 65 C-Wert = 1 gesetzt.

Tabelle 6 : Temperaturabhängige Trockengewichtsproduktion
pro ml Medium zur Herstellung gleicher
Extinktionswerte

Temperatur (C)	50	55	60	65	70	75
T. aquaticus	1.38	1.29	1.01	1.00	1.17	1.63
B. stearothermo- philus	1.55	1.45	1.04	1.00	1.10	-

Der 65 C-Basiswert entspricht bei T. aquaticus 11.2 $\mu\text{g/ml}$
und bei B.stearothermophilus 10.33 $\mu\text{g/ml}$ (pro 0.01 ΔE).

Mit Hilfe der bestimmten Trockengewichtsdaten läßt sich nun für
jede Wachstumstemperatur über eine Extinktionsmessung die je-
weilige Ausbeute angeben, wodurch eine Bilanzierung der
C-Quellenverwertung, wie unter (2.5) angeführt, möglich wird.

3.4 Verbrennungswärmen

Im Gegensatz zur Trockengewichtsbildung pro ml Medium pro
Extinktionseinheit zeigen die verbrennungskalorimetrischen
Daten keinen Temperaturgang. Aus der Abb. 13 wird deutlich,
daß jeder Organismus über seinen gesamten Temperaturbereich
einheitliche Verbrennungswärmen pro g TG liefert: 19.46 kJ/g
für T.aquaticus und 17.79 kJ/g für B.stearothermophilus.
Mit Hilfe dieser Werte ist dann eine Berechnung des Energiege-
halts des entsprechend (3.3) bestimmten Trockengewichts mög-
lich. Etwas anderes als die Temperaturunabhängigkeit der Ver-
brennungswärmen war eigentlich auch nicht zu erwarten, wenn
man davon ausgeht, daß der Kohlenstoff der Zellbausteine, der
ja in der Mikrobombe zu CO_2 verbrannt wird, Hauptverbrennungs-
substanz ist (50 % C - Anteil im Trockengewicht einer
Bakterienzelle, daneben noch 10 - 15 % N, 2 - 6 % P, 10 % H,

20 % O) und sich bei sämtlichen Wachstumstemperaturen im wesentlichen in demgleichen Oxidationszustand befindet (in Lipiden ist die Oxydationszahl etwa -2, in Kohlenhydraten und Eiweißen etwa 0).

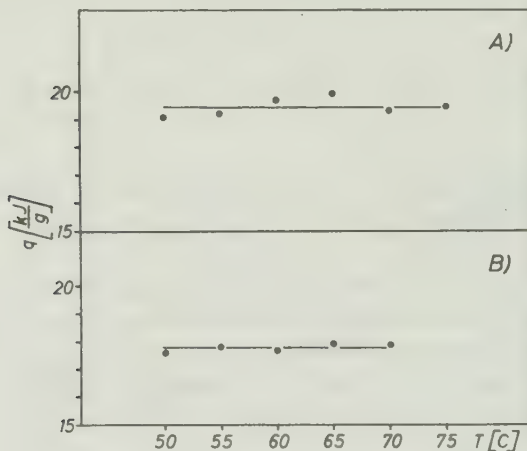


Abb. 13: Temperaturabhängigkeit der Verbrennungswärmen q von *T. aquaticus* (A) und *B. stearothermophilus* (B)

Die Zellsubstanz läßt sich ganz allgemein durch die Formel $(CH_2O)_n$ beschreiben, d.h. der Zellkohlenstoff hat insgesamt den Oxydationszustand 0. Eine mögliche Veränderung der Verbrennungswärmen durch Veränderung des Lipidanteils an den Zellpolymeren mit der Temperatur scheidet schon wegen des geringen Zelllipidgehalts ($\sim 10\%$) aus. Die Gesamtlipidfraktion von thermophilen Organismen scheint außerdem temperaturunabhängig zu sein (INGRAHAM 1962). Dennoch kann die Einzelzusammensetzung der verschiedenen Polymerenarten mit der Temperatur variieren. In der Verbrennungskalorimetrie wird ja nur die Bruttowärme bestimmt.

3.5 Trübungsmessungen am Kolorimeter

3.5.1 Bacillus stearothermophilus

3.5.1.1 Wachstumsvergleich bei verschiedenen Temperaturen und verschiedenem pH

Aus Parallelansätzen in verschlossenen RGSV bei fünf verschiedenen Temperaturen (50,55,60,65,70 C), vier verschiedenen Glucosekonzentrationen (0.1,0.2,0.3,0.5 %), fester NH_4Cl -Konzentration (0.1 %) sowie 10 verschiedenen pH-Werten im Bereich 5.0 - 10.5 konnten die mit den Thermomatenversuchen bestimmten Optimalbedingungen des Wachstums bzgl. der Zellvermehrung bestätigt werden: bei jeder angebotenen Glucosekonzentration war die Geschwindigkeitskonstante der Vermehrung bei 65 C am größten, etwas kleiner bei 60 bzw. 70 C, sehr viel niedriger bei 55 C, noch niedriger bei 50 C. Überraschend war das ausnehmend gute Wachstum über den großen pH-Bereich von 5.3 bis 9.3 bei allen Temperaturen mit nur leichter Präferenz für die alkalischen pH-Werte (Abb. 14).

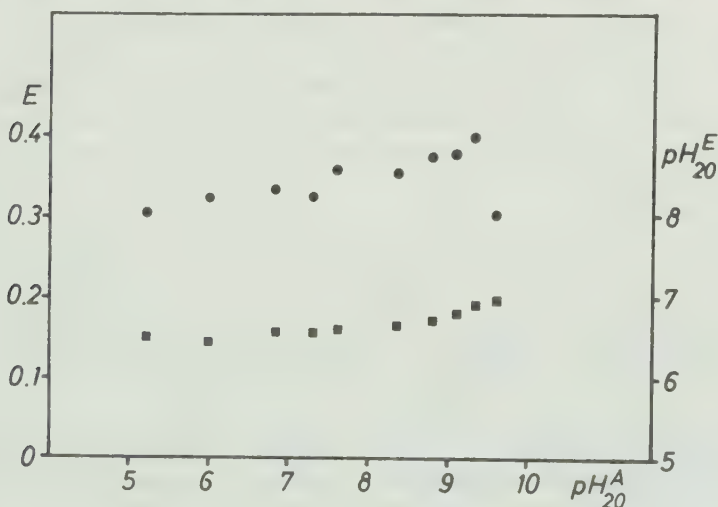


Abb. 14: Abhängigkeit der Endextinktion E (●) und des End- pH_{20} (■) vom Anfangs- pH_{20} für *B. stearothermophilus* in NGCM 0.1/0.2 (65 C)

Auffällig war weiterhin die unterschiedlich gerichtete pH-Verschiebung in Abhängigkeit vom Anfangs-pH: alkalische Medien erfahren stets eine Veränderung zu niedrigeren pH-Werten (saure Richtung), neutrale Medien bleiben im Neutralbereich oder verändern sich nur wenig, während anfangs saure Medien (pH 5.5) sich in die basische Richtung verschieben (Abb. 14). Das gilt zumindest für kleinere Glucosekonzentrationen (0.1, 0.2 %) und läßt auf die Fähigkeit des Organismus schließen, je nach pH unterschiedliche Stoffwechselleistungen erbringen zu können bzw. verschiedene Stoffwechselprodukte anzuhäufen und zu exkretieren, wie es z.B. von *Aerobacter aerogenes* und *Escherichia coli* bekannt ist (BOIVINET 1964, SCHLEGEL 1972) und auch bei *Sulfolobus* entdeckt wurde (BROCK et al. 1972). Der Glucoseverbrauch ist im übrigen für die gleiche Endextinktion bei jeder Temperatur unabhängig vom Anfangs-pH.

3.5.1.2 Variation der Stickstoffkonzentration

Da in den meisten Experimenten nur die Frage der Wachstumsbeeinflussung durch das Glucose- bzw. O_2 -Angebot interessierte, war darauf zu achten, daß die übrigen Nährstoffbedürfnisse des Organismus voll erfüllt wurden. Man kann als grobe Abschätzung für eine ausreichende Stickstoffversorgung folgende Überlegung anstellen:

Wenn man den Stickstoffanteil am Trockengewicht des Organismus mit 10 - 15 % und - bei günstigen Sauerstoffbedingungen - einen Glucoseverbrauch von 1 mg/ml mit einer TG-Produktion von 0.25 mg/ml ansetzt (wie es z.B. bei einer Glucosekonzentration von 0.1 % etwa der Fall ist), entspricht dies einem Stickstoffanteil im produzierten TG pro Volumeneinheit von 0.025 - 0.0375 mg/ml. Wegen des N-Gewichtsanteils im Ammoniumchlorid ($NH_4Cl/N = \sim 3.8$) bedeutet dies, eine NH_4Cl -Konzentration von 0.095 mg/ml bis 0.14 mg/ml im Medium einzustellen (0.0095 - 0.014 %). Wachstum in einem Medium mit deutlich kleinerer NH_4Cl -Konzentration als 0.01 %

sollte daher notwendigerweise durch das Stickstoffangebot begrenzt sein. Wenn man berücksichtigt, daß bei höheren Glucosekonzentrationen der Glucoseverbrauch und damit auch das TG pro Volumeneinheit die angenommenen Werte übersteigen kann (Faktoren 2 - 3), bietet sich eine NH_4Cl -Konzentration von 0.1 % an, um jegliche Wachstumsbegrenzungen durch Stickstoffmangel auch bei höheren Glucosekonzentrationen zu vermeiden.

Wie Abb. 15 zeigt, wird die durchgeführte Abschätzung in vivo recht gut verifiziert. Man erhält bei einer Glucosekonzentration von 0.1 % mit zunehmender Stickstoffkonzentration bis 0.01 % NH_4Cl steigende Extinktionswerte (Δ steigen der TG-Produktion pro Volumeneinheit) und steigende Gesamt-trockengewichtsproduktion (da stets die gleiche Mediummenge vorhanden), von da ab nur noch eine ganz leichte Steigerung der Ausbeute.

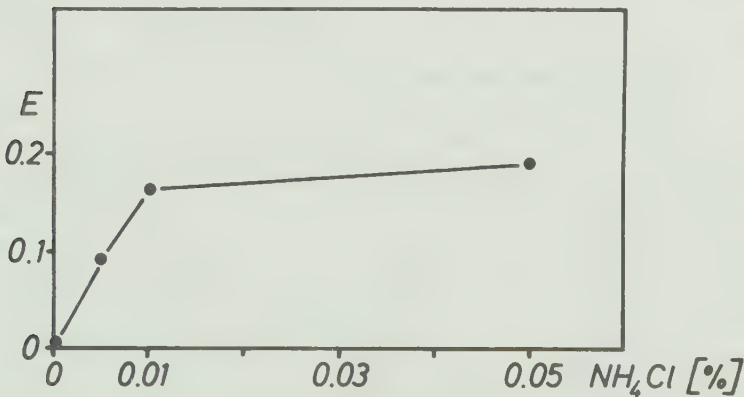


Abb. 15: Einfluß der NH_4Cl -Konzentration auf die Endextinktion E von *B. stearothermophilus* mit 0.1 % Glucose (65 C)

Aus der Auftragung ist weiter zu entnehmen, daß molekularer Stickstoff von *B. stearothermophilus* nicht fixiert werden kann,

denn die Kurve geht durch den Nullpunkt. Bei höheren Glucosekonzentrationen (0.2, 0.5 %) wird das Plateau erst bei 0.05 % NH_4Cl erreicht, das Wachstum unterhalb dieser Konzentration ist also durch Stickstoff limitiert.

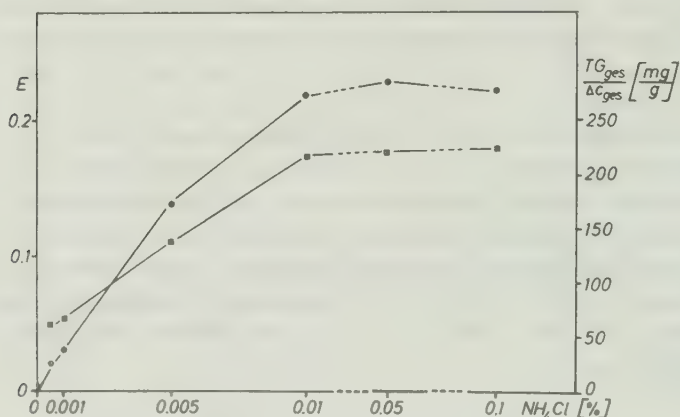


Abb. 16: Abhängigkeit von Endextinktion E (●) und Wirkungsgrad (■) von der NH_4Cl -Konzentration für *B. stearothermophilus* (0.1 % Glucose, 65 °C)

Daß bei geringen N-Konzentrationen eine zumindest teilweise Entkopplung zwischen den energieliefernden katabolischen und den energieverbrauchenden biosynthetischen Prozessen stattfindet, wird bei einer Darstellung des materiellen Wirkungsgrades (g TG/g Glucose) als Funktion der NH_4Cl -Konzentration deutlich (Abb. 16). Trotz gleich großen Glucoseverbrauchs entsteht bei 0.005 % NH_4Cl nur rund 60 % der Trockenmasse, die bei 0.01 % NH_4Cl gebildet wird. Im übrigen verändern größere NH_4Cl -Konzentrationen als 0.1 % (getestet 0.2, 0.3, 0.5 %) das Wachstumsverhalten des Organismus nicht. Hier ergeben sich stets die gleichen Resultate wie mit 0.1 % NH_4Cl .

3.5.1.3 Variation des Sauerstoffangebots

Um den Einfluß des Sauerstoffangebots auf das Wachstum des Organismus und den Wirkungsgrad des Glucoseabbaus zu überprüfen, wurden bei 50 C, 55 C, 60 C, 65 C und 70 C in die verschlossenen RGSV verschiedene Mediummengen eingefüllt (NGCM 0.1/0.1 bzw. 0.1/0.2), wodurch ja gleichzeitig eine Variation des O_2 -Vorrats erreicht wird, da der Luftraum über der Flüssigkeitsoberfläche je nach eingefüllter Mediummenge vergrößert oder verringert wird. Das Wachstum wurde in der Regel bei Mediummengen von 4, 5, 7, 9, 11, 13, 15 und 17 ml verglichen (maximales Volumen der RGSV: 18 ml). Die für diese Experimente typische Abb. 17 zeigt die Kurvenschar der verschiedenen Wachstumskinetiken eines Versuchs bei 70 C in NGCM 0.1/0.2 mit der Mediummenge als Kurvenparameter. Man erkennt, daß die Wachstumsrate von den größten zu den kleinsten Medienmengen, d.h. mit steigendem O_2 -Angebot, deutlich ansteigt. Gleichzeitig nimmt die Ausbeute pro Volumeneinheit zu, hier beschrieben durch die Extinktionswerte der stationären Wachstumsphase.

Wenn man davon ausgeht, daß bei 20 C und 760 Torr in 1 ml Luft ~ 0.28 mg O_2 enthalten und in 1 ml Medium bei Luft-sättigung ~ 9 μg O_2 gelöst sind, kann man - im Fall der verschlossenen RGSV - die Endextinktion (und damit das mg TG/ml Medium) als Funktion des Quotienten mg O_2 /ml Medium darstellen.^{+) Genauso gut würde man natürlich als Abszisse mg O_2 /mg Glucose wählen können, was bei einer Glucosekonzentration von 0.1 % zu denselben, bei 0.2 % zu halb so großen Quotientenwerten führen würde.}

^{+) Die RGSV wurden stets bei Zimmertemperatur (~ 20 C) verschlossen, also befindet sich die dieser Temperatur entsprechende O_2 -Menge im Reaktionsraum (in Luft und Flüssigkeit). Schwankungen der Zimmertemperatur von ± 5 C, die praktisch nie vorgekommen sind (klimatisiertes Labor), verursachen bei der Berechnung des O_2 -Vorrats einen Fehler ± 1.7 %. Druckschwankungen um 760 Torr in der Größe von ± 20 Torr, wie in der Gesamtzeit der Experimente möglich, liefern einen zusätzlichen Fehler von ± 2.2 %, so daß der Maximalfehler durch Temperatur- und Druckschwankungen bei der Berechnung des O_2 -Vorrats ± 4 % beträgt.}

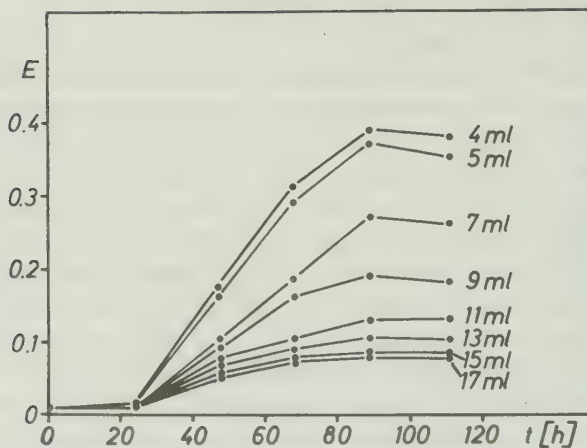


Abb. 17: Wachstumskurven von *B. stearothermophilus* bei verschiedenen Mediummengen in verschlossenen Reagenzgläsern (70 C)

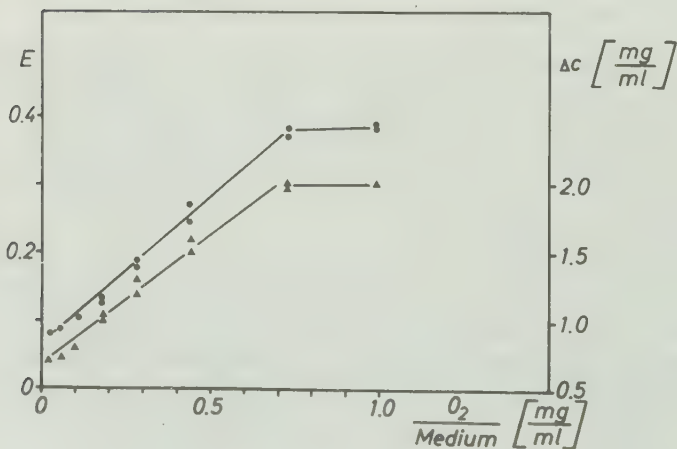


Abb. 18: Endextinktion E (●) und Glucoseverbrauch Δc (▲) als Funktion des O₂-Angebotes für *B. stearothermophilus* in NGCM 0.1/0.2 (70 C)

Den Zusammenhang für das obige Beispiel (Abb. 17) gibt die Abb. 18. Man beobachtet mit zunehmendem Quotienten einen etwa linear ansteigenden Ertrag pro ml Medium bis zu mg O_2 /ml Medium-Werten, bei denen eine weitere Steigerung des O_2 -Angebots die Ausbeute unbeeinflusst läßt oder nur noch schwächer beeinflusst, d.h. die Werte mg TG/ml Medium schwenken bei höherem O_2 /Medium-Verhältnis auf ein einigermaßen konstantes Niveau ein. Dieses Verhalten ist für alle getesteten Wachstumstemperaturen gleich.

Das Abknicken des linearen Kurventeils vollzieht sich in den meisten Fällen bei etwa 0.75 - 0.8 mg O_2 /ml Medium (Δ einer Mediummenge von ~ 5 ml) bei einer Glucosekonzentration von 0.2 %, und zwischen 0.3 - 0.45 mg O_2 /ml Medium bei 0.1 %, d.h. bei etwa dem halben Wert, was wegen der halben Glucosekonzentration plausibel erscheint, wenn stets die gleichen Stoffwechselprozesse ablaufen. Bei einer Auftragung des Trockengewichts (mg/ml) in Abhängigkeit von mg O_2 /mg Glucose würde der Knick an etwa dergleichen Stelle für beide Glucosekonzentrationen liegen. Das bedeutet aber, daß bei beiden Konzentrationen dergleiche O_2 -Einfluß auf den Glucoseverwertungsmechanismus besteht, und daß für den untersuchten *B.stearothermophilus* die Relation von O_2 -Angebot zu vorhandener Glucose entscheidend für Wachstumsverhalten und Ertrag ist.

Dieser offenbar identische O_2 -Einfluß ist insofern überraschend, als eine Glucosemenge von 0.1 % bei einem O_2 -Angebot von 0.8 mg/ml ($\hat{=}$ 5 ml Mediummenge) etwa total aerob metabolisiert werden könnte, aber 0.2 % Glucose nicht mehr. Trotzdem erhält man äquivalente Resultate. Das kann nur heißen:

- a) der Organismus kann anaerob stoffwechseln
- b) er tut das auch, wenn er es gar nicht muß (Fall Glucose 0.1 %); in welchem Umfang, ist hier noch nicht zu beantworten.

Wenn man nun den anfangs - linearen Teil der Kurve in Abb. 18

auf die Ordinate extrapoliert, d.h. auf strikt anaerobe Verhältnisse ($0 \text{ mg O}_2/\text{ml}$), bestätigt sich die Vermutung (a), denn es zeigt sich, daß die Gerade nicht durch den Nullpunkt geht, sondern an dieser Stelle noch einen beträchtlichen Extinktionswert aufweist. Da der im Medium gelöste Sauerstoff bereits berücksichtigt ist, bedeutet dies, daß der Organismus auch unter völlig anaeroben Bedingungen existieren und sich vermehren kann.

Einen ebenfalls linearen Anstieg mit zunehmendem O_2 -Angebot pro ml Medium mit einem Abknicken an der gleichen Stelle wie die Extinktionswerte zeigen die Werte des Glucoseverbrauchs pro Volumeneinheit in Abb. 18.

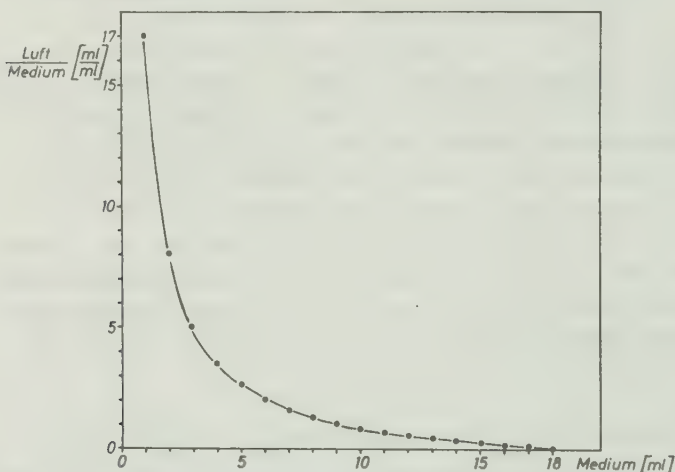


Abb. 19: Veränderung der Wachstumsbedingungen in verschlossenen Reagenzgläsern mit der Mediummenge

Im übrigen würde ein Diagramm der Art: Endextinktion = f (ml Medium) oder = f (ml Luft) unter Umständen zu falschen Rückschlüssen verleiten können. Der Grund hierfür liegt in der versuchsbedingt gleichzeitigen Veränderung von Sauerstoff- und Mediummenge bei verschlossenen RGSV. Trägt man nämlich z.B. den Quotienten ml Luft/ml Medium gegen steigende Mediummengen auf (Abb. 19), so erhält man einen Kurvenverlauf,

der dem Ansatz

$$y = \frac{18 - x}{x} = \frac{18}{x} - 1 \text{ folgt,}$$

wo y = ml Luft/ml Medium und

x = ml Medium ($0 < x \leq 18$),

$18 \hat{=}$ 18 ml = Gesamtvolumen RGSV

eine Kurve also, die eine Veränderung der Wachstumsbedingungen proportional $1/x$ beschreibt. Das heißt aber, daß auch bei einer Darstellung der Endextinktion als Funktion der Mediummenge eine entsprechende Abhängigkeit vorgetäuscht würde, die realiter nicht vorhanden ist. Wenn man die unterschiedlichen O_2 -Diffusionsverhältnisse (bei den verschiedenen Mediummengen) einmal außer acht läßt, entspricht daher die Art der gewählten Auftragung (Abb. 18: Bezug der Ergebnisse auf mg O_2 /ml Medium) einer Versuchsdurchführung in RGSV mit konstantem Mediumvolumen, aber verschieden großem Luftraum über der Flüssigkeitsoberfläche, d.h. konstante Mediummenge bei variablem O_2 -Angebot (in praxi: verschieden hohe RGSV), oder aber, was ebenfalls gleichbedeutend wäre (abgesehen von den Diffusionsverhältnissen), variable Mediummenge bei konstantem O_2 -Angebot, d.h. gleich großer Luftraum über jeder Flüssigkeitsoberfläche (in praxi: wieder verschieden hohe RGSV). Und gerade diese Abhängigkeit sollte ja hier auch untersucht werden.

Um nun festzustellen, inwieweit die mit steigender Mediummenge wegen des abnehmenden Verhältnisses von Flüssigkeitsoberfläche/Volumen ungünstiger werdenden O_2 -Diffusionsverhältnisse eine Rolle spielen, d.h. ob Wachstumsgeschwindigkeit und/oder Ertrag durch die Wahl der Mediummenge a priori beeinflusst werden, wurden dieselben Versuchsansätze wie oben in der wasserdampfgesättigten Atmosphäre eines Wasserbades mit unverschlossenen RGSV unternommen, so daß kontinuierlicher O_2 -Zutritt möglich war, und eventuelle Wachstumsunterschiede allein durch die verschiedenen Diffusionsverhältnisse hervorgerufen werden mußten. Es ergibt sich, daß von 4 - 17 ml

Mediumvolumen der Organismus mit der gleichen Wachstumsrate wächst bis zu einem konstanten Endextinktionswert, der im Falle der verschlossenen RGSV nur bei den Medienmengen 4 oder auch noch 5 ml erreicht wird.

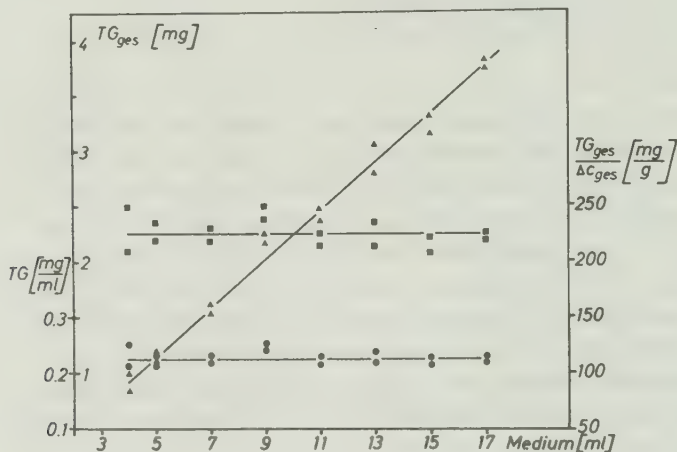


Abb. 20: Trockengewicht pro Volumeneinheit (●), Gesamt-trockengewicht (▲) und materieller Wirkungsgrad (■) von *B.stearothermophilus* in unverschlossenen Reagenzgläsern in NGCM 0.1/0.1 als Funktion der Mediummenge

Die angebotene Glucose (0.1 %) ist bei jeder Probe total verbraucht mit immer dem innerhalb der Fehlergrenzen gleichen Wirkungsgrad (g TG/g Glucose). Das gesamte gebildete Trockengewicht ist eine lineare Funktion des jeweiligen Gesamt-glucoseverbrauchs. Abb. 20 zeigt die Ergebnisse eines Versuchs bei 65 C im Wasserbad in NGCM 0.1/0.1 in Abhängigkeit von der gewählten Mediummenge, die hier natürlich Abszisse sein kann und muß (oder auch $\text{mg Glucose}_{\text{gesamt}}$), da die RGSV nicht verschlossen sind.

Es ist bereits erwähnt und demonstriert worden (Abb. 17,18), daß mit steigendem O_2 -Angebot pro ml Medium bei allen ge-

testeten Wachstumstemperaturen Wachstumsrate, Endextinktion und Glucoseverbrauch pro ml Medium zunehmen. Es bleibt noch zu untersuchen, in welcher Weise bei den verschiedenen Temperaturen die Gesamttrockengewichtsproduktion, der Gesamtglucoseverbrauch und der materielle Wirkungsgrad des Glucoseabbaus, hier definiert als Quotient aus gebildetem Trockengewicht und Glucoseverbrauch, mit dem O_2 -Vorrat korreliert sind. Wenn der Organismus fakultativ aerob ist, sollte man erwarten, daß bei jeder Temperatur mit steigendem O_2 -Angebot pro Volumeneinheit der Wirkungsgrad zunimmt, d.h. daß pro g verbrauchter Glucose immer mehr Trockenmasse produziert wird.

In den Abb. 21 - 23 sind noch einmal sämtliche Ergebnisse der O_2 -Bedarfs-Versuche für alle Wachstumstemperaturen zusammengefaßt (jeweils als Mittelwerte über mehrere Versuche). Abszisse ist die pro Volumeneinheit vorhandene Sauerstoffmenge (mg O_2 /ml Medium). Die C-Diagramme sind im Zusammenhang mit Abb. 18 bereits erklärt worden: sie geben die Trockengewichtsproduktion und den Glucoseverbrauch in 1 ml Mediummenge wieder. Bis auf die 65 C-Kurven, die 2 Knicks aufweisen, zeigen die entsprechenden Funktionen die typische Knickstelle bei 0.75 - 0.8 mg O_2 /ml. In den B-Diagrammen sind die Gesamt-TG-Bildung und der Gesamtglucoseverbrauch dargestellt. Der Glucoseverbrauch steigt für alle Temperaturen mit abnehmendem Quotienten mg O_2 /ml Medium, die Gesamt-TG-Produktion steigt für 50 und 55 C in gleicher Richtung, bei 60, 65 und 70 C pendelt sie sich mit steigender Mediummenge auf einen einigermaßen konstanten Wert ein. Die A-Diagramme repräsentieren die Abhängigkeit des Wirkungsgrades vom O_2 -Angebot: Er steigt an für alle Temperaturen mit der Veränderung von mehr anaeroben zu mehr aeroben Verhältnissen, wodurch der fakultativ aerobe Charakter des Organismus wiederum dokumentiert wird.

Trägt man den Wirkungsgrad als Funktion der Wachstumstemperatur auf, so erhält man mit steigender Temperatur sowohl auf

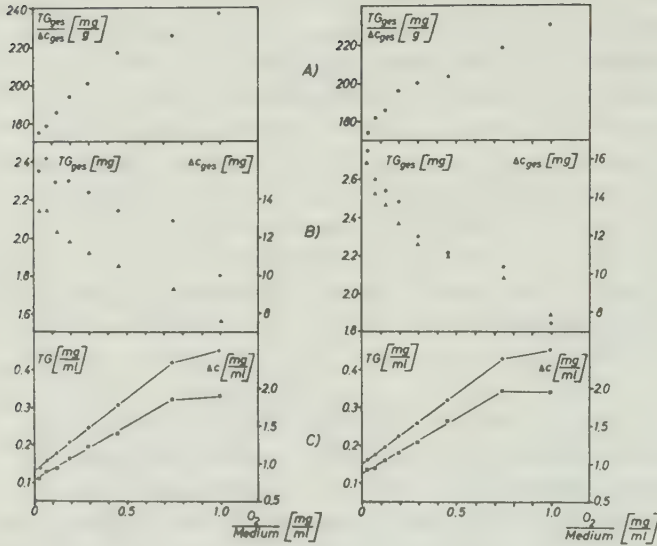


Abb. 21: 50 C (links) und 55 C (rechts)
(Erklärung s. unter Abb. 23)

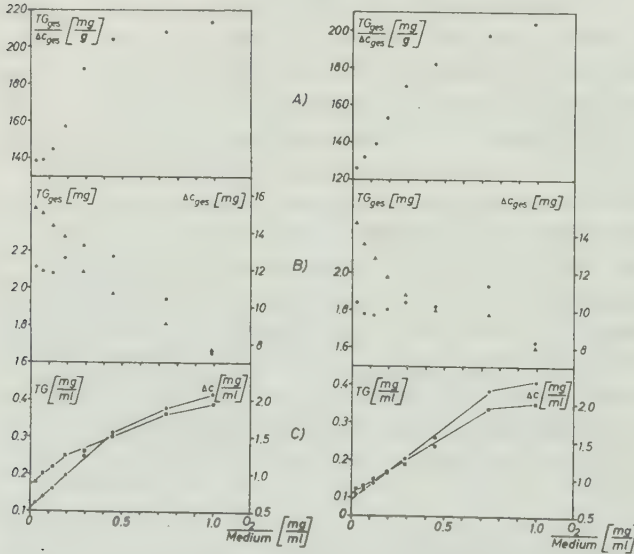


Abb. 22 65 C (links) und 70 C (rechts)
(Erklärung s. unter Abb. 23)

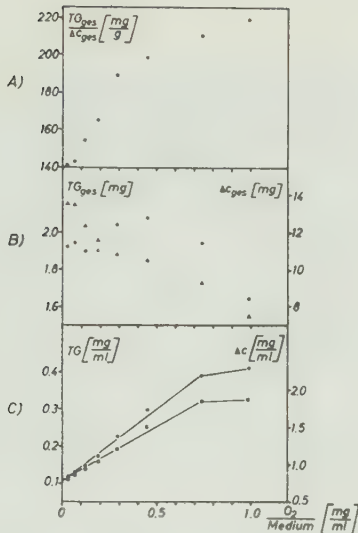


Abb. 23: 60 C

Abb. 21-

- 23: Materieller Wirkungsgrad (A), Gesamttrocken-
gewichtsproduktion (●) und Gesamtglucoseverbrauch (▲) (B), Trockengewicht (●) und Glucoseverbrauch (■) pro Volumeneinheit (C) als Funktion des O_2 -Angebotes für *B. stearothermophilus* in NGCM 0.1/0.2 bei 50, 55, 60, 65 und 70 C

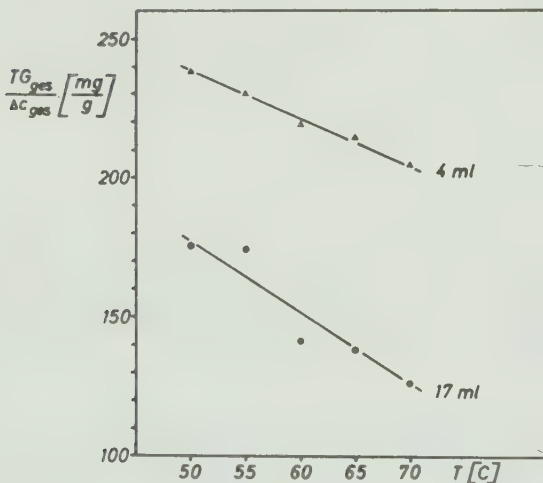


Abb. 24: Materieller Wirkungsgrad von *B. stearothermophilus* unter "aeroben" (▲) und "anaeroben" (●) Verhältnissen in NGCM 0.1/0.2 als Funktion der Wachstumstemperatur

der "aeroben" (4 ml) wie auf der "anaeroben" Seite (17 ml) fallende Trockensubstanzbildung pro g verbrauchter Glucose (Abb. 24), d.h. sich verschlechternde Ausnutzung der Kohlenstoff- und Energiequelle mit zunehmender Temperatur. Das bedeutet, daß der Organismus bei der Temperatur mit der längsten gemessenen Generationszeit (50 C), also unter für die Vermehrung ungünstigen Bedingungen, die beste Verwertung des Energie- und Kohlenstoffvorrats vornehmen kann, und die für das Wachstum optimale Temperatur (65 C) bzgl. der Nahrungs- und Energieverwertung keineswegs optimal ist. Das ist für einen Organismus aber auch nicht so wichtig, denn nach MONOD (1972) ist die Vermehrungsrate der entscheidende Auslese- und Existenzfaktor und nicht die Produktivität.

Im übrigen ist der Wirkungsgrad für alle Temperaturen bei einer Glucosekonzentration von 0.1 % bei den größeren O_2 /Medium-Quotienten etwas besser als bei 0.2 % (er steigt z.B. bei 50 C auf 260 mg TG/g Glucose, bei 65 C auf 230 mg/g an).

Als realistischen Fehlerbereich der Ergebnisse muß man $\pm 10 - 15$ % ansehen. Damit wird die Variationsbreite der Einzelergebnisse ebenso erfaßt wie die Ungenauigkeiten von Glucosetest, TG-Bestimmung (3.3) und Extinktionsmessung. Der "Abfall" des Wirkungsgrades mit der Temperatur wird durch die genannte Fehlerbreite ein wenig relativiert, er ist jedenfalls nicht mehr so eindeutig.

Mit Hilfe der verbrennungskalorimetrischen Daten kann man nach der materiellen nun auch eine erste Energiebilanz aufstellen. Da 1 g Trockenmasse von *B.stearothermophilus* 17.79 kJ entsprechen und 1 g Glucose den Energieinhalt von 15.95 kJ besitzt, ergeben sich die in Tab. 7 aufgeführten energetischen Wirkungsgrade (Zeilen 4 und 5). Ein Wirkungsgrad von 25 % bei voll aeroben Möglichkeiten ist im Vergleich zu den Daten mesophiler Organismen ziemlich schlecht, genauso wie ein materieller Ertrag von ~ 220 mg TG/g Glucose. Es ist aber zu berücksichtigen, daß hier auf total aeroben Glucoseabbau be-

Tabelle 7: Materielle und energetische Wirkungsgrade beim Wachstum von *B.stearothermophilus* für "aerobe" (4 ml) und "anaerobe" (17 ml) Bedingungen in NGCM 0.1/0.2

Temperatur (C)	50		55		60		65		70	
Volumen (ml)	4	17	4	17	4	17	4	17	4	17
TG/Gluc. (mg/g)	237	175	230	174	219	141	214	138	204	126
TG/Gluc. (kJ/g)	4.22	3.1	4.09	3.1	3.9	2.5	3.81	2.5	3.63	2.2
TG _{kJ} /Gluc _{kJ} (%)	26.5	19.4	25.6	19.4	24.5	15.7	23.9	15.7	22.8	13.8

zogen wird, was jedoch - wie auch die Kalorimeterversuche zeigen werden - nicht ganz gerechtfertigt ist, da auch bei ansteigendem O₂-Vorrat pro ml Medium ein mehr oder weniger großer Teil der Glucose stets anaerob metabolisiert wird, so daß pro g Glucose gar nicht mehr 15.95 kJ ausgenutzt werden können. Trotzdem gilt, daß die nicht im Trockengewicht enthaltene Energie der Glucose als Wärme und/oder in exkretierten Stoffwechselprodukten verloren gehen muß. Das wird mit der Kalorimetrie weiter aufzuschlüsseln sein.

Aufgrund der Menge an produziertem Trockengewicht unter anaeroben Bedingungen kann man schon zu diesem Zeitpunkt ausschließen, daß die Glucose nur rein glykolytisch zu Lactat, Pyruvat oder Äthanol abgebaut wird, da man für die Glykolyse mit einem energetischen Wirkungsgrad von 7 - 8 % zu rechnen hat, hier aber mindestens die doppelte Effizienz zu verzeichnen ist (Tab. 7, Spalten: 17 ml).

3.5.1.4 Variation der Glucosekonzentration

Die Abhängigkeit des Wachstums von Mikroorganismen von der Glucosekonzentration ist von vielen Autoren diskutiert worden. Es wird von linearer (BOIVINET 1964, PAYNE 1970, FORREST 1967)

wie hyperbolischer Abhängigkeit (LAMPRECHT 1969) des Zell-
zuwachses mit der Konzentration berichtet sowie von einer
weniger effizienten Nahrungsverwertung bei höheren C-Quellen-
konzentrationen. Es war daher zu fragen, wie *B. stearothermophilus*
auf Konzentrationsveränderungen des Substrats reagiert.

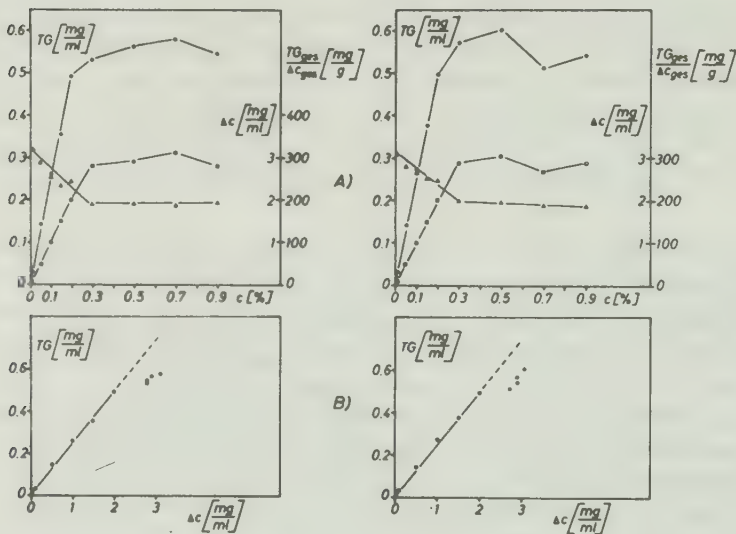


Abb. 25: 50 C (links) und 55 C (rechts)
(Erklärung s. unter Abb. 27)

Die Abb. 25 - 27 zeigen in den Diagrammen A für alle Tempe-
raturen den Verlauf von TG-Produktion und Glucoseverbrauch
pro ml Medium sowie der materiellen Ertragsbilanz für eine
Mediummenge von 4 ml in den RGSV als Funktion des Glucose-
angebots. Die Glucosekonzentration wurde bis zum Faktor 90
variiert: von 0.01 % bis 0.9 %. In allen Fällen steigt die
TG-Produktion (pro ml oder auch gesamt, da alle Ansätze die
gleiche Mediummenge (4 ml) besitzen) linear bis zu einer
Glucosekonzentration von 0.2 % und schwenkt ab 0.3 % auf ein

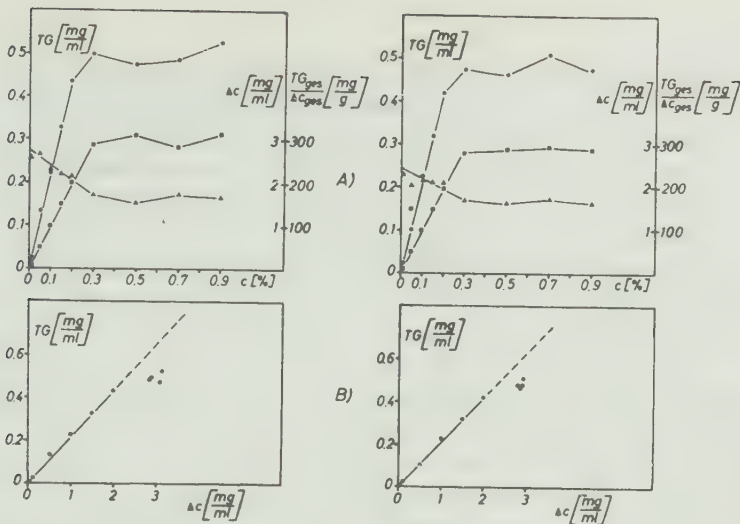


Abb. 26: 65 C (links) und 70 C (rechts)
(Erklärung s. unter Abb. 27)

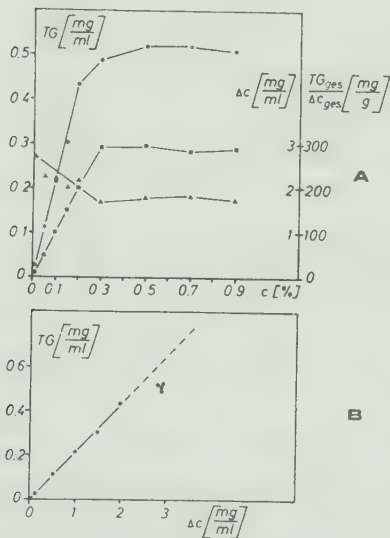


Abb. 27: 60 C

Abb. 25-: Trockengewicht (●), Glucoseverbrauch (■) und
27 materieller Wirkungsgrad (▲) als Funktion der ange-
botenen Glucosekonzentration (A), sowie Trockenge-
wicht als Funktion des Glucoseverbrauchs (B) für
B. stearothermophilus bei 50,55,60,65 und 70 C

annähernd konstantes Niveau ein. Der Glucoseverbrauch steigt ebenfalls linear bis zu einer Konzentration von 0.2 %, fast linear bis 0.3 %, um an dieser Stelle auf ein Plateau einzuschwenken. Der Wirkungsgrad fällt dagegen mit steigender Glucosekonzentration bis 0.3 % ab und bleibt von da ab in etwa konstant. Bei 0.2 % Glucose ist in jedem Fall für alle Temperaturen ungefähr der gleiche Wirkungsgrad abzulesen, wie er bei den O_2 -Bedarfsuntersuchungen für 4 ml Mediummenge erhalten wurde.

In den Diagrammen B der Abb. 25-27 ist die Abhängigkeit der Trockengewichtsproduktion vom Glucoseverbrauch noch einmal gesondert dargestellt. Jeder Punkt des Diagramms entspricht einem Wertepaar bei einer bestimmten Glucosekonzentration in den Diagrammen A. Man erkennt deutlich, daß die für die Konzentrationen 0.3 - 0.9 % erhaltenen Werte nicht mehr auf die Gerade der Werte für Glucosekonzentrationen ≤ 0.2 % fallen, sondern einen zu hohen Glucoseverbrauch mit zu geringer Trockensubstanzbildung besitzen, was die Annahme einer ineffizienteren Nährstoffverwertung nahelegt. Aus der Steigung der Geraden läßt sich eine mittlere Produktivität pro g verbrauchter Glucose für die kleineren Glucosekonzentrationen bestimmen, deren Werte in Tab. 8 angegeben sind.

Tabelle 8: Mittlere Produktivität pro g verbrauchter Glucose als Funktion der Wachstumstemperatur

Temperatur (C)	50	55	60	65	70
$\frac{TG}{Glucose} \left(\frac{mg}{g} \right)$	250	250	215	215	210

Wegen des 40 %-Gehalts an Kohlenstoff in Glucose und des 50 %-C-Gehalts im Trockengewicht von Bakterien, wird direkt für das Zellmaterial das $\frac{50}{40} = 1.25$ fache der TG-Produktion an

Glucose verbraucht, was für die Tabellenwerte bei 50 und 55 C beispielsweise bedeutet, daß $250 \cdot 1.25 \text{ mg} = 312.5 \text{ mg}$ Glucose von 1 g Glucose für die Erzeugung von Zellmaterial eingesetzt werden.

Im übrigen sind die verhältnismäßig großen Ausbeuten bei den kleinsten Glucosekonzentrationen nur mit Vorbehalt zu betrachten, da hier schon kleine Fehler im Glucosetest und bei der Extinktionsmessung das Ergebnis entscheidend verändern können. Daher sind die Werte für den Wirkungsgrad eigentlich erst ab 0.1 % Glucose als realistisch anzusehen.

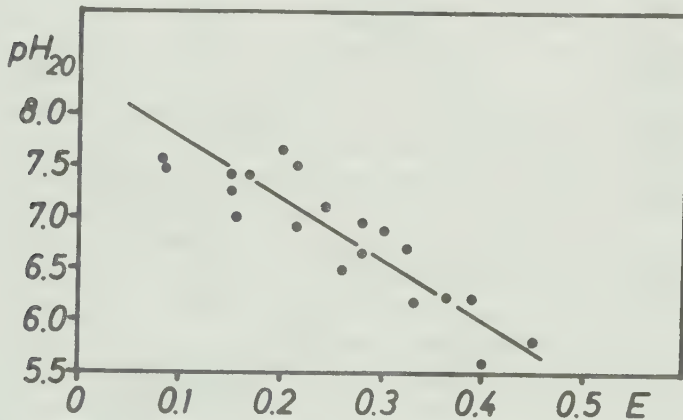


Abb. 28: Abhängigkeit des End- pH_{20} vom produzierten Trockengewicht (ausgedrückt durch die Extinktion E)

Wie sich der pH mit der Trockengewichtsbildung verschiebt (bei alkalischem Anfangs-pH), zeigt Abb. 28, in der der End-pH gegen die Endextinktion aufgetragen ist: Je mehr Trockenmasse produziert wird, desto saurer wird das Milieu, durch Anhäufung exkretierter Stoffwechselprodukte, in-Lösung-gehen von CO_2 etc..

Um zu testen, ob der geringere Wirkungsgrad bei höheren Glucosekonzentrationen mit dem O_2 -Angebot zusammenhängt, wurde bei 65 C ein entsprechender Versuch mit unverschlossenen RGSV im Wasserbad unternommen. Das Ergebnis war, daß bei möglichem ständigem O_2 -Zutritt die Endextinktion auch bei den höheren Konzentrationen noch linear vom Glucoseverbrauch abhing. Damit führt die Interpretation des mit der Glucosekonzentration fallenden Wirkungsgrades in die Richtung der für den Organismus je nach Notwendigkeit einstellbaren, rein anaeroben Stoffwechselprozesse.

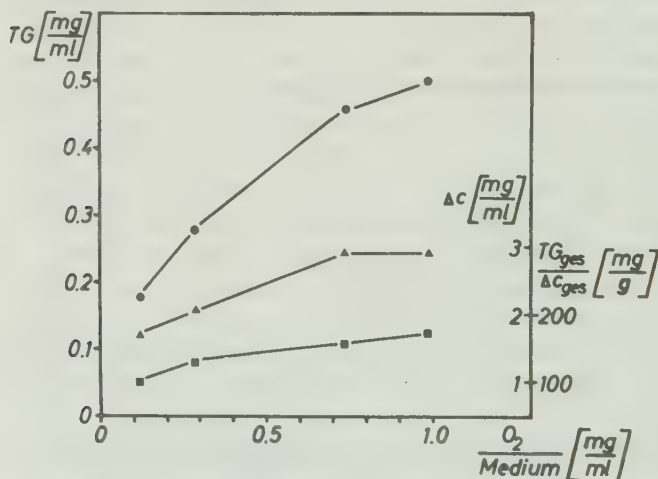


Abb. 29: Sättigungswerte von *B. stearothermophilus* bei 65 C für Mediummengen von 4, 5, 9 und 13 ml in verschlossenen RGSV: Trockengewicht (●), Glucoseverbrauch (▲) und materieller Wirkungsgrad (■)

Trägt man unter Verwendung von Ergebnissen aus Versuchen mit variablem Glucoseangebot (in verschlossenen RGSV) für Mediummengen von 4, 5, 9 und 13 ml die jeweiligen Sättigungswerte von Trockengewicht und Glucoseverbrauch pro ml Medium sowie den materiellen Wirkungsgrad (also diejenigen Werte, die zu den Glucosekonzentrationen von 0.3 - 0.9 % gehören) gegen das

O₂-Angebot auf, erhält man Abb. 29. Diese Darstellung verdeutlicht, daß eine Mediummenge von 4 ml stets die für den Organismus günstigste "Umsetzung" von Glucose in Zellmaterial liefert.

3.5.2 Thermus aquaticus

Kolorimetermessungen bzgl. des Wachstums als Funktion der Temperatur und des pH haben die Messungen am Thermomat für *T.aquaticus* voll bestätigt. Die O₂-Bedarfsversuche ergaben für alle getesteten Temperaturen (50,55,60,65,70,75 C) wie bei *B.stearothermophilus* eine gesteigerte Wachstumsrate und eine größere Ausbeute mit zunehmendem O₂-Angebot. Abb. 30 zeigt den zeitlichen Extinktionsverlauf mit der Mediummenge als Kurvenparameter für CTYEM 0.3 bei 70 C. Einen eindeutigen Beweis für den obligat aeroben Charakter von *T.aquaticus* kann man Abb. 31 entnehmen: die extrapolierte Gerade auf 0 mg O₂/ml Medium geht exakt durch den Nullpunkt. Dies läßt sich für jede Temperatur verifizieren und hat sich dann auch anhand fehlgeschlagener Wachstumsversuche unter Stickstoffatmosphäre und in stickstoffdurchperltem Medium erwiesen. In der Abb. 31 fehlt die für *B.stearothermophilus* typische Knickstelle bei höheren mg O₂/ml Medium-Werten. Das liegt daran, daß das Vollmedium CTYEM bei größerem O₂-Angebot als 1 mg O₂/ml noch sehr viel intensiver und besser ausgenutzt werden kann: in verschlossenen RGSV werden in 0.3 % CTYEM Endextinktionswerte von 1.0 erreicht. Das bedeutet, daß der Schwellenwert (Knickstelle) im CTYEM erst bei sehr viel höheren mg O₂/ml Medium-Quotienten erreicht wird.

Vergleicht man die in CTYEM gewonnenen Ergebnisse mit denjenigen in dem Minimalkomplexmedium YYGM 0.1/0.1/0.1, so fällt sofort auf, daß die YYGM-Kurve den bereits von *B.stearothermophilus* bekannten geknickten Verlauf zeigt und die Extinktionswerte für das gleiche Sauerstoff/Medium-Verhältnis stets

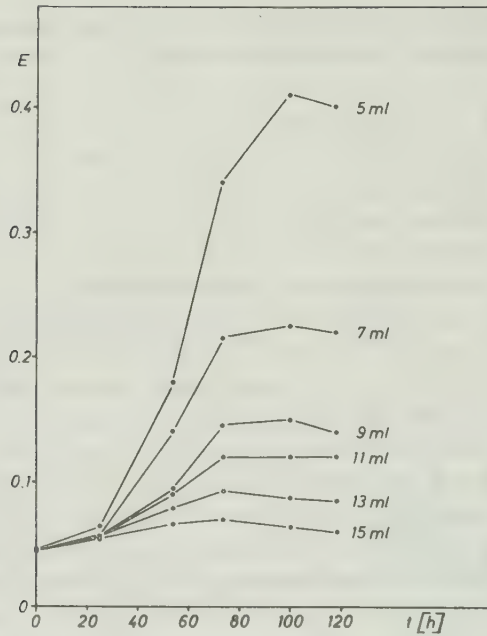


Abb. 30: Wachstumskurven von *T.aquaticus* in CTYEM 0.3 bei 70 C für verschiedene Mediummengen

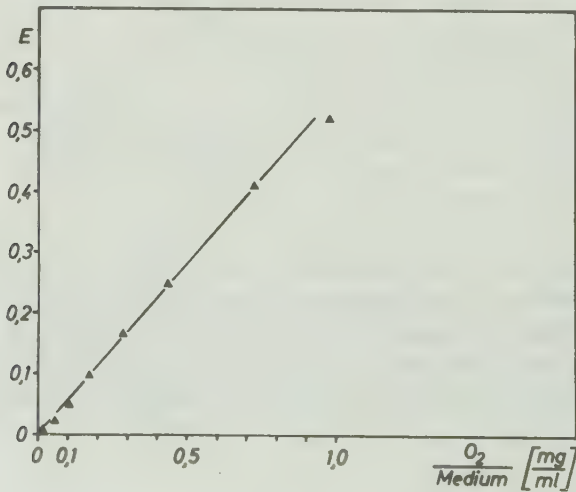


Abb. 31: Endextinktion des *T.aquaticus*-Wachstums in CTYEM 0.3 als Funktion des O₂-Angebots (70C)

niedriger liegen, was auf eine schlechtere Ausbeute in YYGM hinweist. Das Vollmedium CTYEM braucht also für die Produktion der gleichen Menge an Trockenmasse weniger O_2 (weniger Energie) als YYGM, oder anders gesagt: im CTYEM wird bei gleichen Bedingungen stets mehr Zellmasse gebildet als in dem mit Glucose versetzten Minimalkomplexmedium. Das ist verständlich, denn die Zellen müssen im Vollmedium wesentliche Syntheseleistungen gar nicht vollbringen, weil entsprechende Zellbausteine (Aminosäuren etc.) in diesem Medium bereits fertig angeboten werden.

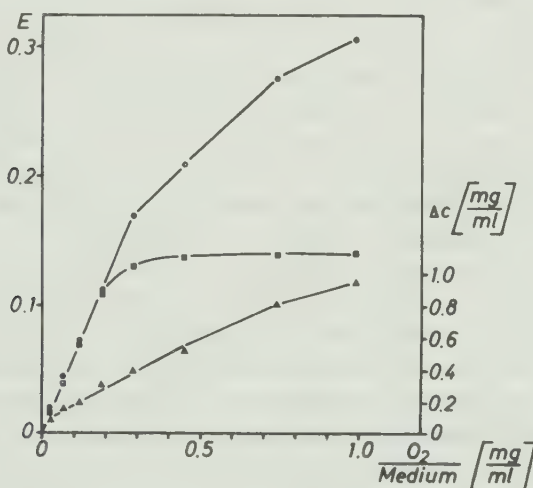


Abb. 32: Endextinktion E des Wachstums von *T. aquaticus* in YYGM 0.1/0.1/0.1 (●) bzw. in YYGM 0.1/0.1/0 (■) sowie Glucoseverbrauch (▲) als Funktion des O_2 -Angebots

In Abb. 32 ist die O_2 -Abhängigkeit des *T. aquaticus*-Wachstums bei 70 C in YYGM 0.1/0.1/0.1 dargestellt. Gleichzeitig ist der Kurvenverlauf für YYGM 0.1/0.1/0 (ohne Glucose) eingezeichnet. Hierzu ist folgendes festzuhalten:

- beide Extinktionskurven dokumentieren, daß *T. aquaticus* obligat aerob ist (durch Extrapolation des linearen Anfangsteils)

- b) bis zu einem $\text{mg O}_2/\text{ml}$ Medium-Quotienten von $\sim 0.20 \text{ mg O}_2/\text{ml}$ ($\approx 11 \text{ ml}$ Medium) unterscheiden sich die Kurven nicht, obschon in YYGM 0.1/0.1/0.1 bereits Glucose verbraucht wird
- c) während im glucosefreien Medium die Extinktionswerte ab $\sim 0.3 \text{ mg O}_2/\text{ml}$ konstant bleiben, steigen sie im mit Glucose versetzten Medium von diesem Quotienten an zwar langsamer als im Anfangsteil, aber doch kontinuierlich an, so daß bei $\sim 1 \text{ mg O}_2/\text{ml}$ eine gegenüber reinem YE/YNB-Medium ungefähr verdoppelte Ausbeute vorhanden ist
- d) der Glucoseverbrauch steigt mit zunehmender Ausbeute ebenfalls an
- e) die Unterschiede der Endextinktions- (und damit der mg TG/ml -) Werte im Sättigungsbereich zwischen Medium mit und Medium ohne Glucose sind für 50 C trotz einigen Glucoseverbrauchs sehr klein und für 55 C ebenfalls wenig ausgeprägt (bei 4 ml Medium: Faktor 1.3). Sie werden bei 60 C schon deutlicher (Faktor 1.6) und erreichen bei 65 C, 70 und 75 C den Faktor 2.

In Tabelle 9 sind für eine Mediummenge von 4 ml für 60, 65 70 und 75 C die Trockengewichtsproduktion und der zugehörige Glucoseverbrauch pro Volumeneinheit sowie der materielle Wirkungsgrad, berechnet nach Korrektur für die Ergebnisse in reinem YE/YNB-Medium (einfache Subtraktion der Werte ohne Glucose von den Werten mit Glucose), sowie TG-Produktion ohne Glucose (reines YE/YNB) zum Vergleich, angegeben. Für Mediummengen oberhalb 11 ml ist wegen der Identität des Kurvenverlaufs in beiden Medien eine Angabe des Wirkungsgrades des Glucoseabbaus nicht möglich. Aber auch bei kleinen Mediummengen ist nicht ohne weiteres zu entscheiden, welcher Medienbestandteil Kohlenstoff - und/oder Energiequelle ist bzw. bleibt, d.h. die Anteile von YE, YNB und Glucose an der Kohlenstoff- und Energielieferung für das Wachstum sind nicht eindeutig zu ermitteln. Beispielsweise könnte Glucose allein als Energiequelle ausgenutzt werden, es

Tabelle 9: Trockengewichtsproduktion, Glucoseverbrauch und Wirkungsgrad von *T.aquaticus* in YYGM 0.1/0.1/0.1

Temperatur (C)	60	65	70	75
TG ($\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$) (mit Glucose)	0.237	0.302	0.4	0.567
TG ($\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$) (ohne Glucose)	0.147	0.146	0.183	0.329
Differenz ($\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$)	0.09	0.156	0.216	0.238
Δc ($\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$)	0.45	0.68	0.95	1.0
$\frac{\text{TG}}{\Delta c}$ ($\frac{\text{mg}}{\text{g}}$)	200	229	227	238

könnten aber auch alle drei Bestandteile diese Funktion haben. Entsprechendes gilt für die Kohlenstoffverwertung. Man entnimmt der Tabelle 9, daß von 60 - 75 C Trockenmassenproduktion, Glucoseverbrauch und der Wirkungsgrad zunehmen. Überraschend ist die Steigerung der Effizienz mit der Temperatur. Allerdings sind die Fehler wegen der starken Streuung der Einzelergebnisse ziemlich groß ($\sim \pm 20 \%$), so daß die Ertragsverbesserung mit der Temperatur nicht gesichert scheint.

Die Abhängigkeit des Wachstums von der angebotenen Glucosekonzentration wurde im Bereich 0.01 - 1 % getestet (mit YE/YNB 0.1/0.1). Man findet eine Steigerung der Ausbeute von 0.01 über 0.05 bis 0.1 %, sie bleibt konstant bis 0.2 % (mit gegenüber 0.1 % erhöhtem Glucoseverbrauch), fällt dann stark ab bei 0.3 %, um ab 0.5 % praktisch auf null zurückzugehen. Höhere Glucosekonzentrationen inhibieren also die Zellvermehrung. Der Verlauf ist in Abb. 33 für 70 C dargestellt. Diese Ergebnisse entsprechen denjenigen der Nährstofftests in Abb. 8.

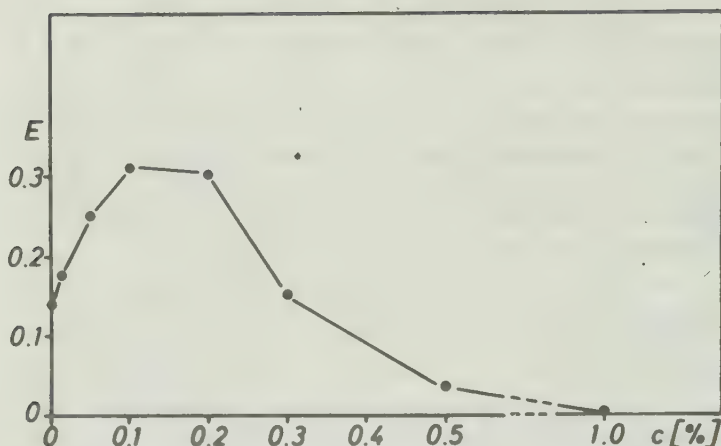


Abb. 33: Endextinktion E des *T.aquaticus*-Wachstums als Funktion der angebotenen Glucosekonzentration in YYGM 0.1/0.1/variabel, 70 C

3.6 Kalorimeterexperimente

Die Reihenuntersuchungen am Kolorimeter gestatteten die Bestimmung der materiellen und energetischen Wirkungsgrade, die sich beim Wachstum der Organismen zwischen energieliefernden und energieverbrauchenden Prozessen einstellen.

Am Kalorimeter kann auf der energetischen Seite noch weiter aufgeschlüsselt bzw. eine direkte Zuordnung vorgenommen werden, wieviel von der angebotenen Energie bei der Produktion einer bestimmten Menge an Trockensubstanz bzw. beim Verbrauch einer bestimmten Menge Glucose aus dem System ungenutzt verschwindet. Es wird also das Quantum an Energie gemessen, das in Form von Wärme unwiderruflich verlorengeht.

3.6.1 Bacillus stearothermophilus

In der Regel wurden die Versuche mit 20 ml Mediummenge durchgeführt, was bei 100 ml Kammervolumen einem O_2 -Vorrat von 1.13 mg/ml entspricht, womit die Bedingungen noch etwas günstiger als im Fall der 4 ml Medium in den RGSV sind. Die fünf getesteten Wachstumstemperaturen waren 50, 55, 60, 65 und 70 C, die Medien waren normalerweise alkalisch (pH 7.5 - 8 bei der jeweiligen Wachstumstemperatur).

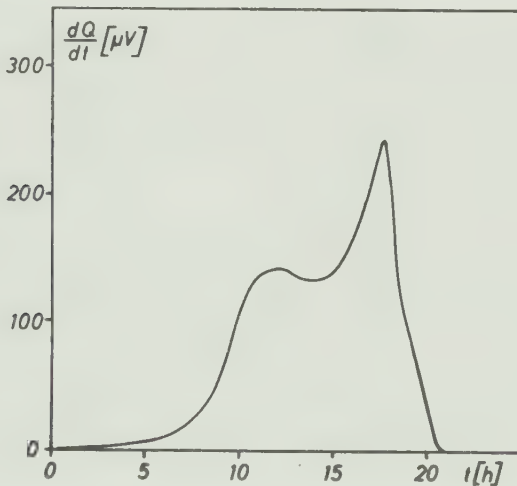


Abb. 34: Thermogramm von *B.stearothermophilus* unter N_2 -Atmosphäre in NGCM 0.1/0.1 (65 C); Ordinatenmaßstab: 100 $\mu V \cong 1.78$ J/sec (gilt auch für alle folgenden Thermogramme)

Ganz generell läßt sich sagen, daß der Verlauf der erhaltenen Wachstumsthermogramme für alle Temperaturen bei gleichen Bedingungen (O_2 -Verhältnisse, Glucosekonzentration) ähnlich ist. Abb. 34 zeigt ein solches typisches Thermogramm (65 C, NGCM 0.1/0.1, N_2 -Atmosphäre). Man beobachtet nach einer lag-Phase zunächst einen schnellen Anstieg des Wärmeflusses, der sich dann verlangsamt, u.U. auch ein wenig abnimmt, so daß ein erstes Maximum auftreten kann; anschließend erfolgt ein

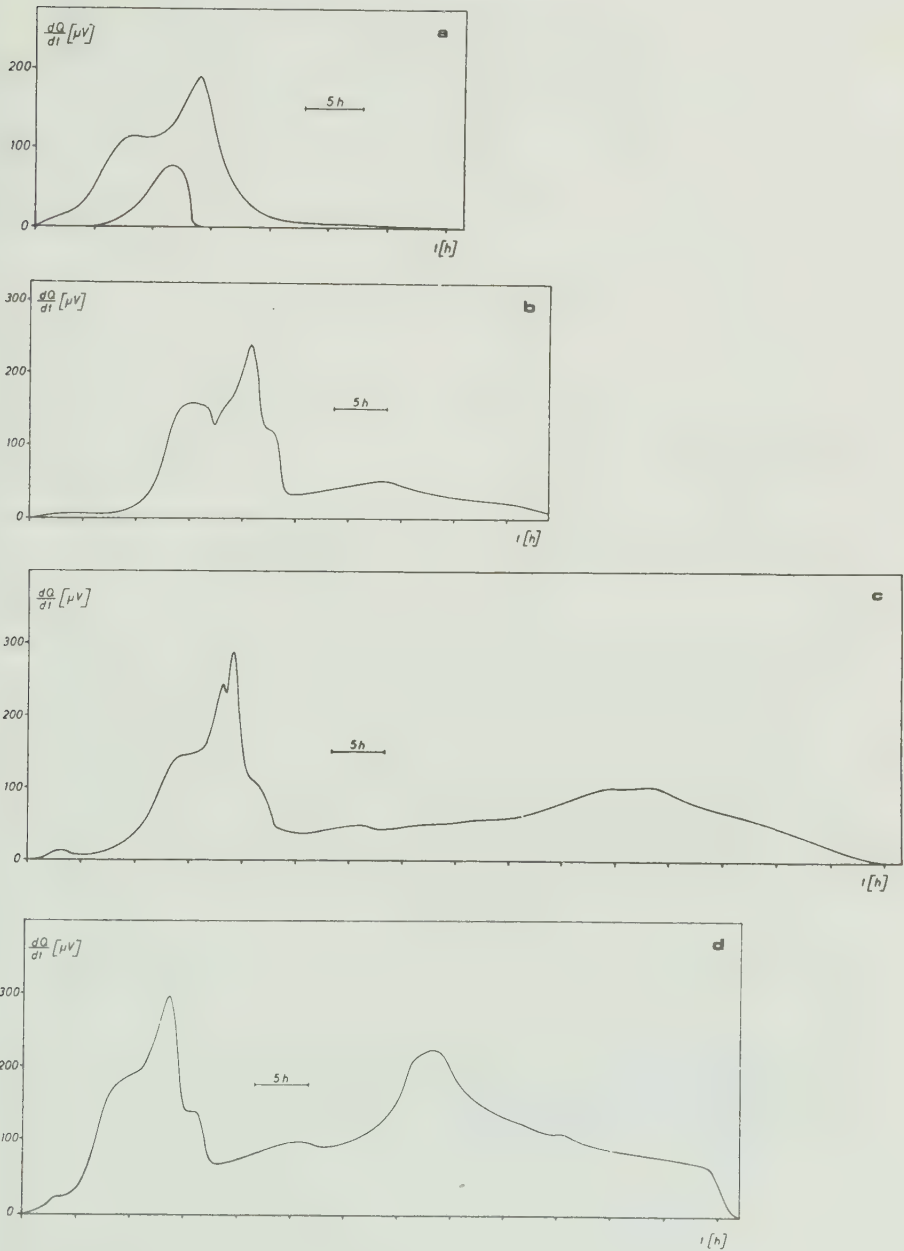
weiterer sehr steiler Anstieg des Wärmeflusses bis zum Hauptmaximum, um danach schnell abzufallen.

Bis zu diesem Punkt ähneln sich also sämtliche erhaltenen Thermogramme, unabhängig von der Wachstumsbedingung, wenn nur der pH alkalisch ist, d.h. der Kurvenverlauf ist dann unabhängig von der Glucose- oder Ammoniumchloridkonzentration, dem O_2 -Vorrat und der Temperatur, Die absoluten Werte der Wärmeabgabe sind für jede Bedingung natürlich unterschiedlich.

Im Anschluß an das Hauptmaximum geht die Wärmeproduktion bei strikt anaeroben Verhältnissen (N_2 -Atmosphäre) direkt auf null zurück (s. Abb. 34), unter aeroben Bedingungen verändert sie sich mit der angebotenen Glucosekonzentration. In Abb. 35 ist die Variation der Wärmeproduktion bei 65 C und 0.1 % NH_4Cl mit der Glucosekonzentration (0.01 - 0.7 %) dargestellt. Man erkennt, daß schon bei 0.05 % die Rückkehr auf null deutlich langsamer vor sich geht als unter N_2 -Bedingungen. Ab 0.1 % fällt der Wärmefluß nach dem Hauptmaximum über eine mehr oder weniger deutlich ausgeprägte Schulter nur bis zu einem über der Nulllinie liegenden Wert ab, um dann ein weiteres, mit steigender Konzentration immer stärker werdendes Maximum zu durchlaufen, das ab 0.5 % das erste Hauptmaximum an Intensität deutlich übertrifft.

Wie nun den abgebildeten Kurven zu entnehmen ist, zeigt *B.stearothermophilus* mehrphasiges (unter N_2 : diauxisches) Wachstum. Daß diese Tatsache bei den Thermomatenmessungen nicht entdeckt wurde, liegt vermutlich am kontinuierlichen Rühren der Suspension; bei den Reihentests am Kolorimeter wurden Verzögerungs- und Umstellungsphasen des Organismenwachstums (Wendepunkte in der Trübungskurve) immer dann entdeckt, wenn in den entsprechenden Wachstumsphasen zeitlich dicht beieinanderliegende Meßpunkte genommen wurden. Auch die sukzessiv integrierte Gesamtwärmeabgabe während des Wachstums demonstriert die verschiedenen Aktivitätsphasen des Organismus gut.

Abb. 35: (Erläuterung s. nächste Seite)



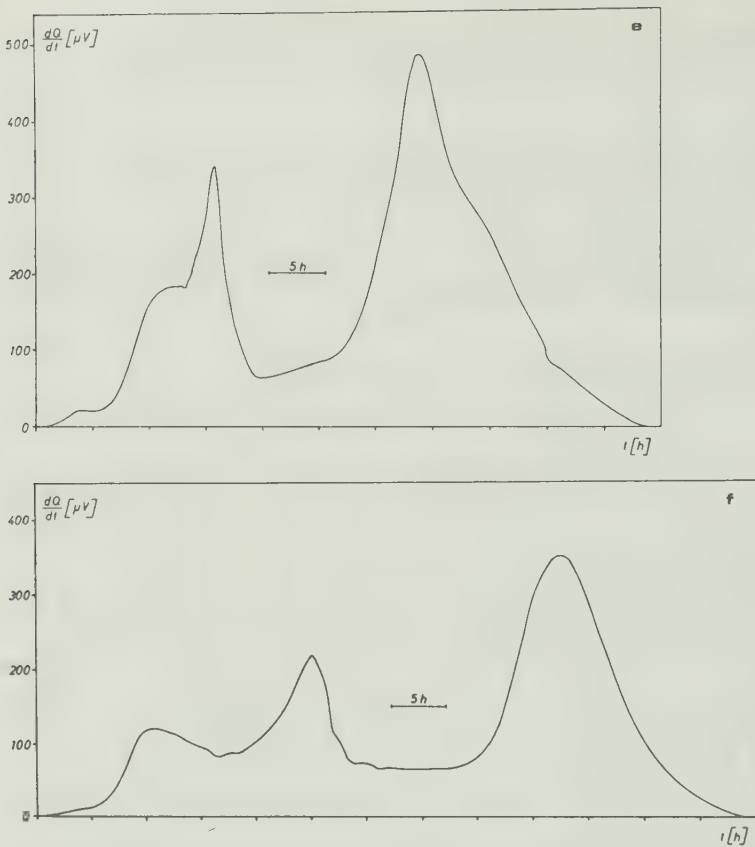


Abb. 35: Thermogrammveränderungen beim Wachstum von *B. stearothermophilus* mit der Glucosekonzentration (NH_4Cl 0.1 %, 65 C)

- a - 0.01 % Glucose (Kurve innen)
- a - 0.05 % (Kurve außen)
- b - 0.1 %
- c - 0.2 %
- d - 0.3 %
- e - 0.5 %
- f - 0.7 %

In Abb. 36 ist zusammen mit der Wärmeflußkurve noch ein solcher zeitlicher Verlauf der Gesamtwärmeabgabe eingezeichnet. Den drei aus dem allgemeinen Verlauf dieser Kurve herausfallenden größeren Steigungen entsprechen die Zeiten maximaler Stoffwechselaktivität (im Bereich der drei Maxima).

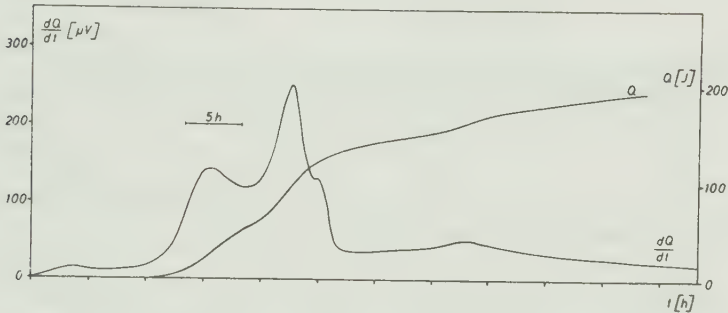


Abb. 36: Wärmefluß dQ/dt und zeitliche Gesamtwärmeabgabe Q des Wachstums von *B. stearothermophilus* bei 65 °C in NGCM 0.1/0.1

Genauso wie sich die Veränderung der Glucosekonzentration im Thermogrammverlauf wiederfindet, beeinflusst die Wahl der $\text{NH}_4 \text{ Cl}$ -Konzentration die registrierten Wärmeflüsse. In Abb. 37 sind die Wärmeflußkurven für drei unterschiedliche $\text{NH}_4 \text{ Cl}$ -Konzentrationen (0.005, 0.01, 0.1 %), aber festem Glucoseangebot (0.2 %) zeitlich verschoben aufgetragen. Im Falle der Kurven 1 und 2 ist das Wachstum durch N-Mangel limitiert, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen unter (3.5.1.2), Kurve 3 repräsentiert "Normalbedingungen" (NGCM 0.1/0.2). Wie unter (3.5.1.2) errechnet sich auch aus den Kalorimetermessungen ein fallender Wirkungsgrad mit fallender $\text{NH}_4 \text{ Cl}$ -Konzentration.

Diese wie auch die vorangehenden Abbildungen demonstrieren die große Empfindlichkeit der kalorimetrischen Nachweismethode für Stoffwechselaktivitäten von Mikroorganismen. Die nur



Abb. 37: Einfluß der NH_4Cl -Konzentration auf die Thermogrammform des *B. stearothermophilus*-Wachstums bei 65 C mit Glucose 0.2 %; 1 - 0.005 % NH_4Cl , 2 - 0.01 %, 3 - 0.1 %

leichte Variation eines einzigen Parameters verursacht eine deutliche Veränderung der registrierten Signale.

Diese große Empfindlichkeit der benutzten Apparatur lieferte auch ein weiteres Indiz für die Vermutung einer unterschiedlichen Stoffwechseltätigkeit von *B. stearothermophilus* im sauren ($\text{pH} < 6$) im Vergleich zum alkalischen Milieu (s. 3.5.1.1).

Die Abb. 38 zeigt dazu zwei Kalorimeterkurven: oben ist die Kurve mit saurem Anfangs-pH, unten diejenige mit dem "normalen" alkalischen pH. Die übrigen Wachstumsbedingungen sind exakt gleich. Es scheint, als ob die beiden Thermogramme, d.h. die Wärmeproduktion während des Wachstums, verschiedene Stoffwechselaktivitäten demonstrierten. Diese könnten durch pH-abhängige Produktion und Exkretion verschiedener Metaboliten gegeben sein, durch zeitliche Verschiebungen innerhalb der Stoffwechselkette oder auch - wenngleich weniger wahrscheinlich - durch die Verwendung unterschiedlicher Abbauewege des Nährstoffs, wie es HERNANDEZ & JOHNSON (1967a) für *Aerobacter cloacae* beschrieben haben. Der Wirkungsgrad scheint aufgrund der wenigen für den sauren Anfangs-pH vorliegenden Ergebnisse demjenigen bei alkalischem pH zu entsprechen, ebenso muß die Wärmeproduktion pro g Glucose und pro g Trockenmasse als pH-unabhängig angesehen werden.

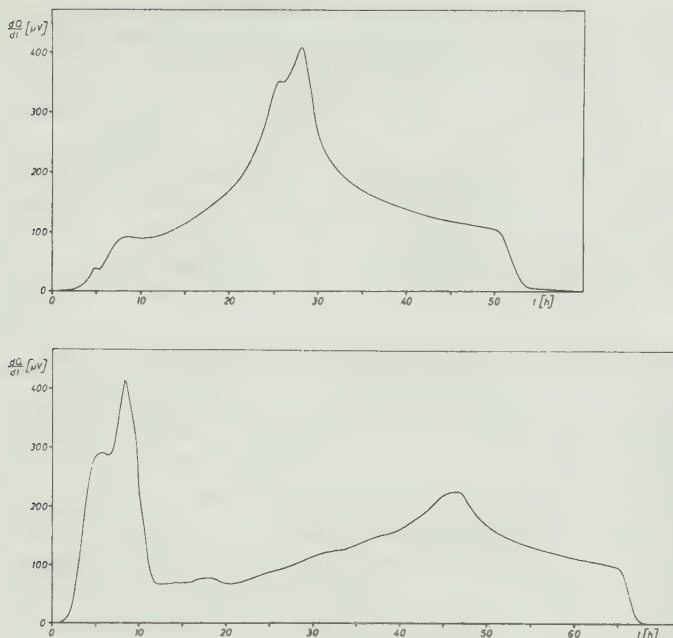


Abb. 38: Vergleich der Thermogramme des Wachstums von *B. stearothermophilus* in NGCM 0.1/0.3, 65 C, bei saurem (oben) und alkalischem (unten) Anfangs- pH_{20}

Allerdings bedarf es zur Untermauerung dieser Aussage noch weiterer Versuche.

Der Versuch, im alkalischen Milieu das erste kleinere Nebenmaximum mit der Phosphatkonzentration zu korrelieren, wie es z.B. BOIVINET (1964) bei *A. aerogenes* gelang, war nicht erfolgreich: mit steigender Phosphatkonzentration in der Castenholzsalzlösung verschwand dieses Maximum nicht.

Interessant erschien die Frage nach dem zeitlichen Verlauf des Glucoseverbrauchs und der damit zusammenhängenden zeitlichen Trockengewichts- und Wärmeproduktion. Dabei interessierte

speziell die Situation nach dem ersten Hauptmaximum: ist die angebotene Glucose hier bereits total zu Intermediärprodukten abgebaut, die in der zweiten Aktivitätsphase weiter verarbeitet werden, entspricht das zweite Maximum nur dem restlichen Abbau noch vorhandener Glucose oder handelt es sich bei diesem Maximum um die Wärmeproduktion von Syntheseprozessen, die nichts mehr mit dem Wachstum zu tun haben (z.B. zunächst reprimierte Enzymsynthese, BOIVINET 1964), und wie sieht es mit der Trockengewichtsproduktion zu diesem Zeitpunkt aus?

Daß sich in der ersten Aktivitätsphase bei jeder Wachstumsbedingung anaerober Glucoseabbau vollzieht, ist aufgrund des Thermogrammverlaufs unter Stickstoffatmosphäre unzweifelhaft. Dennoch muß auch hier schon auf aerobem Wege Energieproduktion stattfinden, denn der Wärmefluß im Falle aerober Verhältnisse ist bedeutend größer als unter N_2 -Atmosphäre. Weiter zeigt sich, daß bis zu Glucosekonzentrationen von 0.1 % die Glucose nach dem Hauptmaximum total abgebaut ist (mit Luft als Atmosphäre; bei N_2 -Atmosphäre ist in keinem Fall ein Glucoseverbrauch von mehr als 1 mg/ml festgestellt worden), bei höheren Konzentrationen sind hier etwa 2/3 (sehr grober Wert) der bei Versuchsende tatsächlich metabolisierten Glucose verschwunden.

Die materielle Ausbeute ist an dieser Stelle noch recht dürftig; sie wird deutlich verbessert in der zweiten Aktivitätsphase. Die Verbesserung wiederum ist konzentrations- und natürlich temperaturabhängig: sie fällt mit zunehmender Konzentration.

Die materiellen Erträge liegen für alle Temperaturen bei den in den Reihentests berechneten Werten, sowohl auf der aeroben wie auf der anaeroben Seite (s. Tabelle 7). Die Wärmeproduktion pro g verbrauchter Glucose erreicht - temperaturunabhängig - einen Wert von ~ 10 kJ/g für den aeroben Fall und ~ 6 kJ/g unter N_2 -Atmosphäre (NGCM 0.1/0.1 bzw. 0.1/0.2).

Wegen des mit steigender Temperatur sich verringernden Ertrages steigt daher die Wärmeproduktion pro g gebildeten Trockengewichts mit der Temperatur und liegt zwischen 35 - 50 kJ/g TG.

Berechnet man die im produzierten Trockengewicht enthaltene Energie (17.79 kJ/g TG für alle Temperaturen) und addiert jeweils den "Wärmewirkungsgrad" (abgegebene Wärme pro g verbrauchter Glucose), so kann energetisch bilanziert werden:

Da der aerobe Abbau von 1 g Glucose 15.95 kJ freisetzt, ergeben sich aufsummierte Energiebeträge, die zwischen 92 und 87 % der verfügbaren Energie repräsentieren (Luftatmosphäre), und unter N₂ 61 bis 51 % (Grenzen jeweils 50 C und 70 C). Das heißt aber, daß im Falle aerober Bedingungen $\sqrt{10}$ % der Energie der Glucose weder als Trockengewicht noch als Wärme, sondern in Form von ausgeschiedenen Intermediärprodukten wiederzufinden sein müssen, womit die früher geäußerte Vermutung Unterstützung erhält, daß selbst bei Möglichkeit rein aeroben Abbaus zum Teil noch anaerobe Prozesse ablaufen.

Weiter erkennt man, daß unter anaeroben Verhältnissen ein Abbauweg beschritten wird, der immerhin noch im Mittel 55 % der in der Glucose enthaltenen Energie freisetzt (dagegen Glykolyse : 7 - 8 %). Der Organismus verwertet die freiwerdende Energie allerdings nur zu einem sehr viel kleineren Prozentsatz. Nur etwa 28 - 23 % der Energie der Glucose im aeroben und 20 - 12 % im anaeroben Fall finden sich im Zellmaterial wieder. Der Rest geht, wie man sieht, entweder als Wärme oder als ausgeschiedene, nicht weiter verwertbare Stoffwechselprodukte verloren.

Sämtliche Daten der Kalorimeterexperimente von B.stearothermophilus sind in Tabelle 10 zusammengefaßt.

Tabelle 10: Kalorimeterexperimente *B.stearothermophilus*: Trockengewichts- und Wärmeproduktion pro g verbrauchter Glucose, Wärmeproduktion pro g gebildeten Trockengewichts, Energieäquivalent TG pro g verbrauchter Glucose sowie prozentuale Anteile der Wärmeabgabe und Trockenmassenbildung an der pro g Glucose verfügbaren Energie (A bzw. B); Medium: NGCM 0.1/0.2

Temperatur(C)	50	55	60	65	70
aerobe Verhältnisse (20 ml Medium, Luftatmosphäre)					
TG/ Δc (mg/g)	251	238	213	216	209
Q/ Δc (kJ/g)	10.2	9.9	10.3	10.2	10.2
A) % von 15.95 kJ	63.9	62.1	64.6	63.9	63.9
Q/TG (kJ/g)	40.7	41.7	48.5	47.3	49.0
Energieäquivalent					
TG/ Δc (kJ/g)	4.47	4.23	3.79	3.84	3.72
B) % von 15.95 kJ	28	26.5	23.8	24.1	23.3
(A) + B) (%)	91.9	88.6	88.4	88.0	87.2
anaerobe Verhältnisse (20 ml Medium, N ₂ -Atmosphäre)					
TG/ Δc (mg/g)	183	162	132	127	107
Q/ Δc (kJ/g)	6.5	5.6	6.2	6.2	6.2
A) % von 15.95 kJ	40.8	35.1	38.9	38.9	38.9
Q/TG (kJ/g)	35.6	34.4	47.4	48.8	58.0
Energieäquivalent					
TG/ Δc (kJ/g)	3.26	2.88	2.35	2.26	1.91
B) % von 15.95 kJ	20.4	18.1	14.7	14.2	12.0
(A) + B) (%)	61.2	53.2	53.6	53.1	50.9

Die energetischen Wirkungsgrade erhöhen sich, wenn man das Energieäquivalent der produzierten Trockenmasse nicht auf den theoretischen Energiegehalt von 1 g Glucose (15.95 kJ), sondern auf den experimentell hier nachweisbaren Energiegehalt bezieht, also z.B. bei 50 C auf 92 % von 15.95 kJ im aeroben und auf 61 % von 15.95 kJ im anaeroben Fall. Die korrigierten Werte sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Korrigierte energetische Wirkungsgrade von *B.stearothermophilus*

Temperatur (C)	50	55	60	65	70
Wirkungsgrad aerob (%)	30.5	29.9	26.9	27.4	26.7
Wirkungsgrad anaerob (%)	33.3	34.0	27.4	26.7	23.6

Die Wirkungsgrade für den aeroben und den anaeroben Fall sind damit für die jeweilige Temperatur nach Korrektur etwa gleich groß.

3.6.2 Thermus aquaticus

Für *T.aquaticus* wurden wegen der unter (3.5.2) geschilderten Unsicherheiten, die Energie- bzw. Kohlenstoffquelle eindeutig definieren zu können, Thermogramme nur bei 65, 70 und 75 C aufgenommen. Die Mediummenge war wie bei *B.stearothermophilus* stets 20 ml, als Medien wurden YYGM 0.1/0.1/0 bzw. 0.1/0.1/0.1 gewählt, so daß für den - aeroben - Glucoseabbau genügend Sauerstoff zur Verfügung stand: etwa 1.13 mg O₂ pro ml Medium bzw. pro mg Glucose (nötig wären nach $C_6H_{12}O_6 + 6 O_2 \longrightarrow 6 CO_2 + 6 H_2O$ nur ~1.07 mg O₂/mg Glucose).

Der Thermogrammverlauf des wachsenden Organismus enthüllt keine Besonderheiten: die Kurve, d.h. der zeitliche Wärmeausstoß, steigt bis zu einem Maximalwert an und fällt dann überaus langsam wieder bis zur Nulllinie ab. Der lange "Schwanz" wird vermutlich durch sich allmählich verschlechternde Milieubedingungen, z.B. eine pH-Absenkung, hervorgerufen. Die Wachstumskurven in reinem YE/YNB-Medium unterscheiden sich von denjenigen im mit Glucose versetzten Medium nur durch einen zu jedem Zeitpunkt geringeren Wärme-
fluß.

Für die Bilanzierung auf Glucosebasis wurden die in den Experimenten ohne Glucose erhaltenen Versuchswerte von den jeweiligen Daten mit Glucose subtrahiert, wie z.B. in Tabelle 9 genauer aufgeschlüsselt. Das gilt sowohl für die Trockengewichts- wie für die Wärmeproduktion.

Tabelle 12 gibt, gemittelt über jeweils mehrere Experimente und korrigiert für reines YE/YNB-Medium, die Werte für den materiellen Wirkungsgrad (mg TG/g Glucose), für das diesem Wirkungsgrad entsprechende Energieäquivalent (also dem energetischen Wirkungsgrad in absoluten Zahlen) sowie den prozentualen energetischen Wirkungsgrad (Bezug des Energieäquivalents auf 15.95 kJ, den Energiegehalt von 1 g Glucose). Darüber hinaus finden sich in der Tabelle 12 die Werte für die im Verlauf des Wachstums produzierte Wärme pro g verbrauchter Glucose und pro g gebildeten Trockengewichts. Man erkennt, daß der aus den Kalorimeterexperimenten errechnete materielle Ertrag gut mit den Werten aus den Kolorimeterexperimenten übereinstimmt (s. Tab. 9), also - unter Berücksichtigung der Fehlerbreite ($\pm 15\%$) - eine für die drei Temperaturen etwa konstante Ausbeute vorliegt. Dementsprechend sind die energetischen Wirkungsgrade ebenfalls ungefähr gleich groß (27 - 30 %). Sie liegen darüber hinaus im Vergleich zu den *B.stearothermophilus*-Daten (Tab. 10) etwas höher, u.U. eine Folge der gegenüber *B.stearothermophilus* ausgeprägteren Thermophilie von *T.aquaticus* (*T.aquaticus* hat ja höhere Optimal- und Maximaltemperatur).

Tabelle 12: Kalorimeterexperimente *T.aquaticus*; materielle, energetische und Wärme-Wirkungsgrade (Einzelheiten siehe Text)

Temperatur (C)	65	70	75
TG/Glucose (mg/g)	224	235	243
Energieäquivalent TG (kJ/g Glucose)	4.36	4.57	4.74
TG _{kJ} /Glucose _{kJ} (%)	27.2	28.6	29.7
Q/Glucose (kJ/g)	11.05	12.3	11.7
Q/TG (kJ/g)	49.4	52.3	48.3

Die Differenz zwischen dem Energieinhalt von 1 g Glucose (15.95 kJ) und dem Energieäquivalent taucht für jede Temperatur praktisch vollständig (unter Beachtung des 15 %-Fehlerintervalls) als während des Wachstums abgegebene Wärme auf: Im Mittel über die drei Temperaturen werden beim Abbau von 1 g Glucose ca. 11.7 kJ an Wärme freigesetzt. Das ist etwas mehr, als beim aeroben *B.stearothermophilus*-Wachstum verlorengehen (10.2 kJ/g). Die Wärmeproduktion pro g entstandener Trockensubstanz liegt - wiederum temperaturunabhängig - bei 50 kJ/g TG, und damit in der Größenordnung der *B.stearothermophilus*-Resultate für 65 und 70 C (s. Tab. 10).

3.7 Hitzeresistenz

3.7.1 Absterbekinetiken

Zur Überprüfung der Resistenz gegen Hitzebehandlung wurden die Bakterienzellen verschiedenen Temperaturen ausgesetzt. Dabei wurden sie in reinem Puffer (Tris/HCl, pH 7.8 für jede Temperatur) oder auch in einem mit Glucose versetzten Puffer gehalten.

3.7.1.1 Thermus aquaticus

Die Abb. 39 zeigt die Kurvenschar der Absterbekinetiken von verschiedenen Behandlungstemperaturen des bei der optimalen Wachstumstemperatur gezogenen Organismus in reinem Tris/HCl. Es wird deutlich, daß die Abtötungsrate mit steigender Temperatur zunimmt und in der beobachteten Zeit für jede Temperatur in etwa konstant ist. Im großen und ganzen handelt es sich dabei um Kinetiken erster Ordnung.

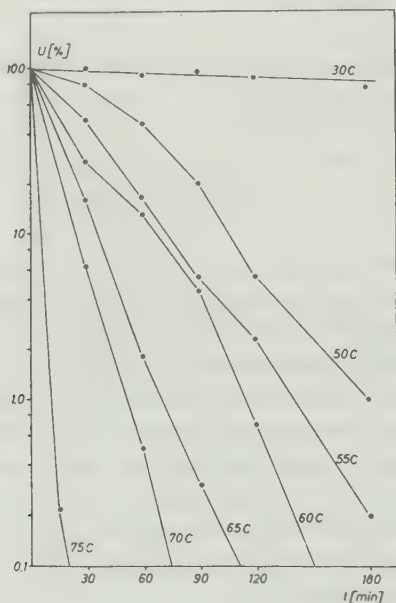


Abb. 39: Absterbekinetik von *T.aquaticus* bei verschiedenen Behandlungstemperaturen; Überlebende = f(Behandlungsdauer)

Bei 75 C überleben nach 15minütiger Behandlungszeit nur ~ 0.2 % der ursprünglich vermehrungsfähigen Zellen, bei 50 C überleben noch 1 % der Kontrolle eine dreistündige Hitzebehandlung. Die Abb. 39 demonstriert, daß *T.aquaticus* bei höheren Temperaturen bei Fehlen einer Nährstoffquelle und/oder Mineralsalzlösung nicht für längere Zeit existieren

kann. Um zu sehen, ob *T.aquaticus* bei Vorhandensein einer Energie- und C-Quelle gegenüber der Hitzeeinwirkung resistenter wird, wurden entsprechende Versuche in mit 0.1 % Glucose versetztem Tris/HCl-Puffer durchgeführt, die aber die gleiche Tendenz zeigen, obschon die Abtötung etwas, aber nicht signifikant, langsamer vor sich zu gehen scheint: bei 50 C gibt es nach 3 h noch 3 % Überlebende, bei 75 C nach 15 min noch 0.3 %.

3.7.1.2 Bacillus stearothermophilus

Ein gegenüber *T.aquaticus* unterschiedliches Verhalten bei Hitzebehandlung zeigt *B.stearothermophilus* (Abb. 40). Nach einer Reduktion der Lebendzellzahl in den ersten 30 - 60 min pendelt sich die Überlebensrate in der beobachteten Zeitspanne von 3 h bei jeder Temperatur auf einen ungefähr konstanten Prozentsatz ein (bei Berücksichtigung der Fehlergrenzen). Auch hier scheint die Abtötung mit steigender Behandlungstemperatur stärker zu werden, dennoch sind die Unterschiede in den konstanten Endwerten nicht sonderlich prägnant.

Eine etwas andere Fragestellung beleuchtet die Abb. 41. Hier stammen die Zellen von unterschiedlichen Wachstumstemperaturen (50, 55, 60, 65, 70 C), haben aber die gleiche Behandlungstemperatur (65 C). Die Zellen der niedrigsten Wachstumstemperatur werden am stärksten, diejenigen der höchsten Wachstumstemperatur am schwächsten abgetötet. Bis auf die 50 C-Probe scheinen die übrigen Ansätze bei längerer Behandlungsdauer auf ein konstantes Niveau einzuschwenken. Insgesamt ist auch hier die Abtötung nicht besonders stark ausgeprägt.

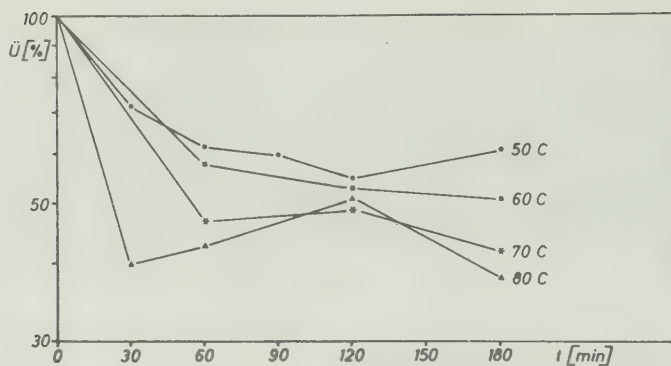


Abb. 40: Absterbekinetik von *B. stearothermophilus* bei verschiedenen Behandlungstemperaturen

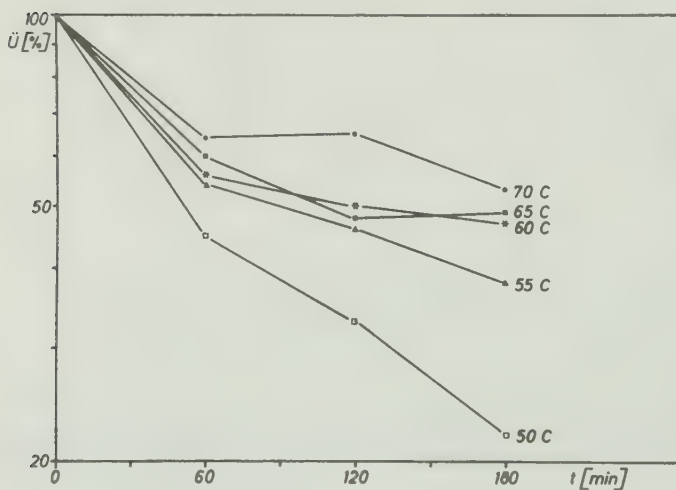


Abb. 41: Absterbekinetik von *B. stearothermophilus* bei 65 C mit verschiedenen Züchtungstemperaturen

3.7.2 Leakage

Ein "Loch" in der Zellmembran stellt u.U. einen irreparablen Schaden dar und bedeutet automatisch den Tod der Zelle, wenn die zellulären Bestandteile herausdiffundieren können. Die Frage war daher: lassen sich nach Hitzebehandlung der Zellen durch eine Absorptionsmessung organische Substanzen im Medium nachweisen?

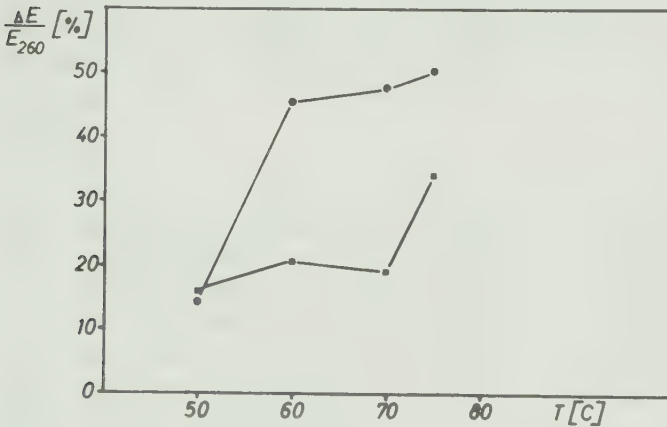


Abb. 42: Freisetzen organischen Materials aus *T.aquaticus*-Zellen in Puffer mit (■) und ohne (●) Mineral-salze als Funktion der Behandlungstemperatur

Abb. 42 zeigt für *T.aquaticus*, bei 70 °C gezogen, das Ergebnis für eine einstündige Behandlung bei 4 verschiedenen Temperaturen in reinem Tris/HCl sowie in mit der Salzlösung versetztem Puffer. Aufgetragen gegen die Behandlungstemperatur ist die prozentuale Zunahme der Extinktion bei 260 nm durch herausdiffundierendes organisches Material. Dabei wird auf die jeweils unbehandelte Kontrollprobe bezogen. Man erkennt ein verstärktes Freisetzen des Zellmaterials mit der Temperatur in reinem Puffer, was im Falle des salzhaltigen Puffers deutlich reduziert ist.

In jedem Fall wird klar, daß die Zellschädigung durch Hitze ein Herausfließen organischer Bestandteile aus der Zelle verursacht, was mit der Annahme eines Membranlochs vereinbar scheint.

Für *B.stearothermophilus* erhält man entsprechende Ergebnisse: mit zunehmender Behandlungstemperatur wird immer mehr 260 nm absorbierendes Material aus den Zellen freigesetzt, was durch Zugabe von Mineralsalzen ins Puffermilieu z.T. erheblich reduziert werden kann.

4. DISKUSSION

4.1 Arrheniusdiagramm und Aktivierungsgrößen des Wachstums von *Thermus aquaticus*

Der allgemeine Verlauf eines Arrheniusdiagramms vom mikrobiellen Wachstum beginnt bei der Minimaltemperatur mit meist drastischen positiven Veränderungen der Wachstumsrate (hohe Aktivierungsenergien) bis zu einer Temperatur, von der ab die Steigung der Kurve für einen bestimmten Temperaturbereich konstant bleibt (konstante Aktivierungsenergie). Erst bei der Optimaltemperatur flacht die Gerade ab (Wachstumsrate maximal), um oberhalb T_{opt} stark abzufallen (Wachstumsrate mit starker Abnahme).

Abweichungen vom linearen Kurventeil sind häufig beschrieben worden (FARRELL & ROSE 1967a). Dennoch hat es nicht an Versuchen gefehlt, die oftmals beobachtete Linearität zwischen $\log k$ und $\frac{1}{T}$ auch bei solch einem komplexen biologischen Vorgang wie dem Mikробenwachstum zu erklären. Diese Linearität beschreibt in der Tat erstaunlicherweise die gleiche Art der Abhängigkeit von der Temperatur für eine Vielzahl aufeinanderfolgender Stoffwechselschritte in einer Bakterienzelle wie für eine einfachste chemische Reaktion vom Typ: $A + B \rightarrow AB$.

Schon 1925 wurde von CROZIER die nach ihm benannte Theorie formuliert, nach der die Geschwindigkeitskonstante mikrobieller Wachstumsprozesse oder anderer Stoffwechselleistungen durch den langsamsten Prozeß innerhalb einer Reaktionskette begrenzt wird. Dabei kann der geschwindigkeitsbestimmende Schritt innerhalb der Kette mit der Temperatur variieren, was im Arrheniusplot an einem Knick zu erkennen ist. Diese Überlegung von der Schrittmacherreaktion wurde aber von BURTON (1936) und MONOD (1942) aufgrund experimenteller Belege zurückgewiesen, und muß als unzulässige, zumindest sehr grobe Simplifizierung des Problems angesehen werden.

Allerdings hat man auch heute noch keine überzeugende Interpretation der biologischen Fakten, die im Arrheniusplot dargestellt werden, zur Verfügung.

INGRAHAM (1958) hat nun versucht, aufgrund der berechneten Aktivierungsenergien für verschiedene Mikroorganismen eine Einteilung nach Temperaturgruppen im gesamten biokinetischen Temperaturgebiet vorzunehmen mit der Tendenz: steigendes ΔH^+ von psychro - über meso - zu thermophilen Organismen. Wenn man sich allerdings Tab. 13 anschaut, kann man nicht zu dem Schluß kommen, daß die absoluten Zahlenwerte der Aktivierungsenergien irgendeine Bedeutung für psychrophilen, mesophilen oder thermophilen Charakter haben könnten.

Die Ergebnisse von EPSTEIN & GROSSOWICZ (1969a) und die eigenen Untersuchungen an *T.aquaticus* zeigen eine Abhängigkeit der Aktivierungsgrößen vom Medium und sind somit nicht in Einklang mit MONOD's (1942) Resultaten, der bei verschiedenen Substraten beim *E. coli*-Wachstum stets gleiche Aktivierungsenergien errechnete.

Von NG et al. (1962), SHAW (1967) und MEEKS & CASTENHOLZ (1971) wurde auf einen anderen Zusammenhang des linearen Kurventeils des Arrheniusplot biologischer Aktivitäten aufmerksam gemacht: innerhalb des Temperaturbereichs konstanter Aktivierungsenergie wird bei Temperaturverschiebungen direkt die Wachstumsrate der neuen (Shift-) Temperatur angenommen. Shiftexperimente zwischen Temperaturen außerhalb und innerhalb dieses Temperaturbereichs führen dagegen zu lag-Perioden und Übergangs-Wachstumskinetiken. Die Shiftexperimente mit *B.stearothermophilus* decken sich mit diesen Beobachtungen (s. 3.2.2). Die Konstanz der Werte der freien Aktivierungsenergie des Wachstums von *T.aquaticus* in verschiedenen Medien (~ 109 kJ/Mol) deckt sich mit dem von LAMPRECHT (1969) erwähnten Befund für *Saccharomyces cerevisiae* (ΔG^+ zwischen 98.3 und 106.7 kJ/Mol). In der zitierten Arbeit werden entsprechende Werte auch für verschiedene Mikroorganismen angegeben: ΔG^+ soll stets bei 96.7 ± 5.4 kJ/Mol liegen.

Tabelle 13: Aktivierungsenergien des Wachstums verschiedener Mikroorganismen

Organismus	Temperaturgruppe	ΔH^+ (kJ/Mol)	Autor
<i>Pseudomonas</i>	psychro	37.9	INGRAHAM (1958)
<i>Escherichia coli</i>	meso	58.6	INGRAHAM (1958)
<i>Escherichia coli</i>	meso	66.9	NG et al. (1962)
<i>Escherichia coli</i>	meso	55.2	MONOD (1942)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	meso	59.8-81.6	LAMPRECHT (1969)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	thermo	56.5-62.8 mediumabhängig	EPSTEIN & GROSSOWICZ (1969a)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	thermo	74.9	LAMPRECHT et al. (1974)
<i>Streptococcus faecalis</i>	meso	43.1 > 30 C 88.3 < 30 C	FORREST (1967)
<i>Zymomonas mobilis</i>	meso	46.4 < 33 C	FORREST (1967)
<i>Bacillus</i>	thermo	85.4	WARD & COCKSON (1972)
<i>Synechococcus lividus</i>	thermo	57.5	MEEKS & CASTENHOLZ (1971)
<i>Thermus aquaticus</i>	thermo	66.9-75.3 mediumabhängig	REILING (1976)
enzymkatalysierte Reaktionen, physiologischer Temp.bereich		20.9-83.7	

Interessanterweise haben aber auch völlig andere biologische Vorgänge wie der O_2 -Verbrauch von Hamster und Ratte sowie die Herzfrequenz der Maus freie Aktivierungsenergien im Bereich von 83.7 - 104.6 kJ/Mol (nach LAMPRECHT 1969).

Die von LAMPRECHT (1969) berechneten Aktivierungsentropien des Wachstums für *S.cerevisiae* decken mit Werten von - 51.5 bis - 204.6 J/K·Mol die für *T.aquaticus* gefundene Streuung gut ab (- 92.5 bis - 125.5 J/K·Mol). Diese Werte entsprechen den Daten enzymkatalysierter Reaktionen.

4.2 Strukturelle und morphologische Zellveränderungen mit der Temperatur ?

Der Zusammenhang von produzierter Zellmasse (dem Äquivalent des gespeicherten Kohlenstoffs und der gespeicherten Energie) und zugehörigem Extinktionswert ist für die verschiedenen Wachstumstemperaturen in Abb. 12 dargestellt. Die Frage ist, wodurch der etwas eigenartige Kurvenverlauf beider Bakterienstämme hervorgerufen wird.

Schon BEHLEHRADEK (1935) hat festgestellt, daß ganz generell die Zellgröße von Organismen bei niedrigen Wachstumstemperaturen größer ist und mit steigender Temperatur abnimmt bis zu einem Punkt, an dem sie wieder beginnt, zuzunehmen. Unterschiedlich gerichtete Zellgrößenveränderungen mit der Temperatur für verschiedene Mikroorganismen werden bei CHRISTOPHERSEN (1973) erwähnt. Auch GRAINGER (1973) schloß aufgrund verbrennungskalorimetrischer Messungen an Bäckerhefe auf eine Variation der Zellgröße mit der Temperatur, und zwar war sie bei 40 C am größten, bei 30 C am kleinsten und lag bei 20 C zwischen diesen beiden Werten.

Für den hier beschriebenen Kurvenverlauf der Bakteriendichteverteilung pro Extinktionseinheit bieten sich morphologische und auch strukturelle Veränderungen der Zellen mit der Temperatur ebenfalls als Erklärung an. Es muß sich also nicht

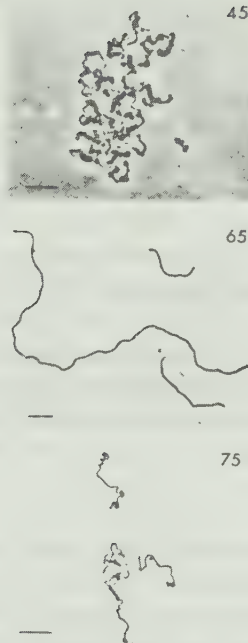


FIG. 1. Phase contrast photomicrographs of cells grown at 45, 65, and 75 °C. Bar indicates 5 μ m

Abb. 43: Morphologische Zellveränderungen mit der Wachstumstemperatur von *M.thermoautotrophicum* (nach ZEIKUS & WOLFE 1973)

nur um Variationen der Zellgröße handeln, auch Änderungen von Zellform und Zellstrukturen (Zellwände) sind möglich. NOVITSKY et al. (1974) haben solche Veränderungen beim Wachstum eines fakultativen *B.coagulans* registriert (unterschiedliche Zellgröße und -form, sowie unterschiedliche Zellwandstrukturen und -zusammensetzungen).

ZEIKUS & WOLFE (1973) beobachteten morphologische und ultrastrukturelle Modifikationen mit der Wachstumstemperatur bei *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Die beachtlichen Unterschiede von *M.thermoautotrophicum* für drei Temperaturen sind in Abb. 43 zu sehen. Die Zellwand der bei 45 °C gewachsenen Zellen wird bis zu fünfmal dicker als diejenige der bei 65 °C (der Optimaltemperatur) gewachsenen Zellen, die 75 °C-Zellen haben immerhin noch eine 2.5fach stärkere Zellwand als die

65 C-Zellen. Die ganze Palette der strukturellen Modifikationen von *M. thermoautotrophicum* bei den Grenztemperaturen umfaßt Veränderungen der Zellform (stäbchenförmig→sphärisch), Zellwandveränderungen, Zerstörung von Septa und innere Membranentartungen. Ähnliche Ergebnisse brachten Untersuchungen an *B.subtilis* bei niedrigen Temperaturen (NEALE & CHAPMAN 1970) und an einer temperatursensiblen Mutante von *B.subtilis* bei hohen Temperaturen (COLE et al. 1970, beide nach ZEIKUS & WOLFE 1973). Auch BROCK & FREEZE (1969) erwähnen für *T.aquaticus* morphologische Veränderungen mit der Temperatur (und natürlich dem Wachstumsstadium der Kultur).

Daß die beschriebenen Zellveränderungen mit der Temperatur Veränderungen in der TG-Produktion pro Volumeneinheit und damit im Extinktionsverhalten nach sich ziehen können, erscheint plausibel. Genau das aber ist die Aussage der beiden Kurven in Abb. 12.

Eine entsprechende Art der Abhängigkeit hat LAMPRECHT^{+) für *Bacillus stearothermophilus*, Stamm NCIB 8923, erhalten. Im Gegensatz dazu konnte NG (1969) für *E. coli* bei 10 C und 37 C keine Unterschiede in der Dichteverteilung pro Extinktionseinheit entdecken, und COULTATE & SUNDARAM (1975) bestimmten für einen prototrophen *B.stearothermophilus*-Stamm ein Trockengewicht von 0.447 mg/ml für eine Extinktionseinheit von 1 (680 nm) bei 43 C und 0.453 mg/ml bei 55.6 C, also keine Veränderung mit der Temperatur. Dieses Ergebnis wurde in zwei verschiedenen Medien erhalten und ist prinzipiell natürlich genauso möglich wie eine Veränderung der Extinktionseigenschaften mit der Temperatur. Zu bedenken ist aber, daß in beiden zitierten Arbeiten jeweils nur zwei Temperaturwerte getestet worden sind, für die keine Unterschiede festgestellt wurden. Aufgrund des Kurvenverlaufs in Abb. 12 lassen sich jedoch ebenfalls je zwei auseinanderliegende Temperaturen}

^{+) unveröffentlicht}

angeben, für die die Trockengewichtsproduktion pro ml Medium die gleiche Extinktion hervorruft. Dennoch muß eine ganz allgemeine Gesetzmäßigkeit für eine Temperaturabhängigkeit morphologischer und struktureller Veränderungen von Mikroorganismen nicht notwendigerweise existieren.

4.3 Materieller Wirkungsgrad beim thermophilen Wachstum

Seit MONOD's (1942) grundlegenden Arbeiten über nur durch die Energiequelle begrenzte Wachstumserträge als Funktion des Substrates, der Substratkonzentration, der Wachstumsrate und der Wachstumstemperatur in aeroben Kulturen von *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* und *Salmonella typhimurium* haben Angaben über Zellausbeuten steigende Bedeutung als Hilfsmittel und wichtige Ergänzung physiologischer Untersuchungen gewonnen. Schwierigkeiten bereitet allerdings auch heute noch zum großen Teil die sinnvolle und korrekte Einordnung und Deutung des Zahlenmaterials, das die Studien an aeroben Organismen liefern, was die Anwendbarkeit und Zuverlässigkeit der Daten aerober Zellerträge erheblich einschränkt. Das liegt an unvollständigen Kenntnissen der Stoffwechselprozesse ebenso wie an den Unsicherheiten, den Grad, das Ausmaß der Oxidation des Substrates angeben zu können.

Gesicherter sind dagegen die Aussagen über die anaeroben Reaktionen, die z.T. in allen Einzelheiten bzgl. der Abbauprodukte und Energieverhältnisse analysiert sind. Speziell der glykolytische Abbaumechanismus mit seinen Endprodukten Lactat oder Äthanol ist vollständig aufgeklärt.

Nun ergeben sich bei Ertragsfragen immer dann Komplikationen, wenn das Substrat, z.B. Glucose, nicht nur Energie-, sondern gleichzeitig noch Kohlenstoffquelle ist, wenn also ein nicht unerheblicher Teil des Glucosekohlenstoffs ins Zellmaterial eingebaut wird. Das geschieht auf dem Niveau der C_4 -Verbindungen des Citronensäurezyklus, bis zu deren Entstehung

(über den C_2 -Körper aktivierte Essigsäure) ja bereits beachtliche Energiebeträge in Form energiereicher Phosphatbindungen produziert worden sind. Die Synthese essentieller Zellkomponenten kann darüber hinaus z.T. weitere ATP-Bildung nach sich ziehen, obschon primär sicherlich nur mit ATP-Verbrauch zu rechnen ist.

Man müßte also eigentlich, um eine korrekte detaillierte materielle (und entsprechend auch energetische) Wachstumsbilanz ziehen zu können, folgende Punkte aufgeklärt haben:

- a) den Abbauweg des Substrates oder der Substrate und die zugehörige ATP-Netto-Produktion
- b) bei mehreren Substraten: die Aufteilung in Energie- und Kohlenstoffquelle
- c) den Kohlenstoffeinbau in Zellmaterial
- d) die chemische Zusammensetzung der Zellen

Darüber hinaus müßten nach STOUTHAMER & BETTENHAUSEN (1973) noch der Energieverbrauch beim Betriebsstoffwechsel eines Organismus sowie seine Wachstumsrate bekannt sein. Beide Größen sollen die Bilanzierung stark beeinflussen.

Der Effekt der Wachstumsrate auf den Wachstumsertrag ist experimentell von ROSENBERGER & ELSDEN (1960) an *Streptococcus faecalis*, NG (1969) an *Escherichia coli*, HARRISON & LOVELESS (1971) an *Klebsiella aerogenes* und BASCHNAGEL DE PAMPHILIS & HANSON (1969) an *Bacillus subtilis* abgesichert worden: nur bei den größeren Wachstumsraten ist der Ertrag unabhängig von der Zellvermehrung (bei HARRISON & LOVELESS nichtmals das), ein Ergebnis, das die MONOD'schen (1942) Untersuchungen nur für starke biosynthetische Aktivitäten bestätigt.

Mit diesen einleitenden Bemerkungen soll darauf verwiesen werden, in welchem Rahmen die weiter unten diskutierten Ergebnisse zu betrachten sind, wie relativ ungesichert, grob und

spekulativ bestimmte Aussagen sein können, denn von den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Organismen ist weder der allgemeine Stoffwechsel bekannt noch (bei *T.aquaticus*) die Energie- bzw. Kohlenstoffquelle eindeutig definiert, und die Energieproduktion (ATP) beim Wachstum sowie die chemische Zellzusammensetzung ebenfalls nicht. Die Interpretation der Ergebnisse kann also nur eine Approximation an die Realität darstellen.

4.3.1 Einfluß der Glucosekonzentration auf den Gesamtertrag

MONOD (1942) fand eine lineare Korrelation zwischen anfänglicher Glucosekonzentration und Zellproduktion beim aeroben Mikrobenwachstum. Ein entsprechendes Ergebnis bis zu einer Glucosekonzentration von 1 % erhielt FORREST (1967) bei Wachstumsstudien an anaeroben *Zymomonas mobilis*-Kulturen. Andere Autoren (z.B. LAMPRECHT 1969, BOIVINET 1964, HADJIPETROU et al. 1964, COULTATE & SUNDARAM 1975) registrierten an verschiedenen aeroben und anaeroben Mikroorganismen die direkte Proportionalität zwischen TG-Produktion und angebotener Glucosekonzentration nur bis zu Konzentrationen im Bereich 0.05 - 0.07 %, darüber, wenn getestet, nur noch eine reduzierte oder gar keine Ausbeutenzunahme.

Wie aus den Abb. 25 - 27 in Kapitel (3.5.1.4) ersichtlich, steigt für *B.stearothermophilus* der Ertrag linear bis zu einer Glucosekonzentration von 0.2 % für alle Temperaturen, für *T.aquaticus* (Abb. 33 in (3.5.2)) gilt diese Beziehung nur bis 0.05 %, allenfalls noch bis 0.1 %. Wie für *B.stearothermophilus* in unverschlossenen RGSV gezeigt werden konnte (3.5.1.4), ist der annähernd hyperbolische Kurvenverlauf der mg TG/ml Medium-Kurve in Abb. 25 - 27 jedoch nicht auf die höhere Glucosekonzentration, sondern auf einen Sauerstoffmangeleffekt zurückzuführen, bei *T.aquaticus* scheint es sich bei den Konzentrationen ≥ 0.2 % um einen der Substrathemmung analogen Vorgang zu handeln.

Es ist ein wenig überraschend, daß für alle Mikroorganismen diese Linearität zwischen produzierter Zellsubstanz und der Glucosekonzentration zumindest in den Bereichen geringerer Konzentration Gültigkeit zu besitzen scheint, da die Ansprüche an das Substrat je nach Organismencharakter sehr unterschiedlich sein können. Anaerobe Fermentationen sind sehr viel unkomplizierter als die Wachstumsprozesse von prototrophen Aerobiern. Zu letzteren gehört der hier untersuchte fakultative *B.stearothermophilus*-Stamm ebenso wie COULTATE & SUNDARAM's (1975) Organismus. Anaerober Metabolismus in einem Komplexmedium liefert beim Glucoseabbau - wie sich anhand vieler Untersuchungen offenbart hat (z.B. BAUCHOP & ELSDEN 1960 oder BELAICH & SENEZ 1967) - praktisch nur die Energie für die Biosyntheseprozesse, aber nicht den Zellkohlenstoff, ganz im Gegensatz zum aerob prototrophen Wachstum, bei dem der Glucosekohlenstoff bis zu 50 % (NG 1969, COULTATE & SUNDARAM 1975, bei PAYNE 1970 werden sogar ~60 % angegeben) in Zellmaterial umgesetzt wird (beim hier untersuchten aeroben *B.stearothermophilus*-Wachstum geht etwa jedes dritte Glucose-C-Atom in die Syntheseleistungen).

4.3.2 Ertragskoeffizienten und O₂-Abhängigkeit des Ertrages

Die bei der Optimaltemperatur der Vermehrung bestimmten ökonomischen Erträge (= materielle Erträge) liegen unter aeroben Bedingungen für *B.stearothermophilus* bei 216 mg TG/g Glucose, für *T.aquaticus* bei 227 mg/g, was einem molaren Ertrag von 38.9 (*B.stearothermophilus*) bzw. 40.9 (*T.aquaticus*) g/Mol Glucose entspricht. Unter anaeroben Bedingungen ergibt sich für *B.stearothermophilus* 130 mg TG/g Glucose ($\hat{=}$ 23.4 g/Mol), *T.aquaticus* kann hier nicht wachsen. PAYNE (1970) gibt als Mittelwerte für mesophile, aerob wachsende Mikroorganismen (Pseudomonaden) 0.419 g TG/g Glucose bzw. 75.4 g/Mol an, für Anaerobier 0.117 g/g Glucose bzw. 21 g/Mol. Damit liegen die für aerobe Verhältnisse berechneten Erträge der beiden unter-

suchten thermophilen Organismen deutlich unter den Angaben für mesophile Organismen, für anaerobe Verhältnisse leicht darüber. Tabelle 14 gibt die Erträge für eine Reihe verschiedener Mikroorganismen wieder.

SENEZ (1962) hat als Erklärung für reduzierte Erträge eine Entkopplung katabolischer und anabolischer Prozesse vorgeschlagen. Das deckt sich mit den Angaben von FORREST (1967), nach dem bei Bakterien die Energieproduktionsrate nicht notwendigerweise durch die Energieverbrauchsrate bestimmt wird. Eine generelle Regulation der katabolischen Stoffwechselprozesse soll fehlen. Die Extremfälle totaler Entkopplung bzw. enger Kopplung zwischen energieliefernden und energieverbrauchenden Prozessen sind der Betriebsstoffwechsel nicht wachsender Zellen bzw. das exponentielle Wachstum in einem geeigneten Nährmedium.

Entkopplungsprozesse innerhalb der gesamten Stoffwechselkette, die sich vom Abbau der energiereichen Nährstoffmoleküle bis hin zur energieverbrauchenden Synthese essentieller Zellkomponenten erstreckt, sollten also immer dann vorliegen, wenn gleichgroßer katabolischer Glucoseverbrauch sich nicht in gleichgroßer Zellsubstanzproduktion manifestiert.

Eine solche "chemische Entkopplung" (Verschlechterung der Ernährungsbedingungen → für Wachstum ungeeigneter werdendes Medium) haben auch ROSÉNBARGER & ELSDEN (1960) bei *Streptococcus faecalis* festgestellt: die katabolische Aktivität lief mit unverminderter Rate ab, die anabolische Aktivität wurde reduziert durch verringerte Verfügbarkeit von Nährstoffen. Daraus resultiert dann eine schlechtere Effizienz des Nährstoffabbaus. Auch die an *B.stearothermophilus* beobachtete Verschlechterung des materiellen Wirkungsgrades bei stickstofflimitiertem Wachstum (s. 3.5.1.2, Abb. 16) würde in die Vorstellung der chemischen Entkopplung passen. Ein hierzu konträres Ergebnis erhielten BASCHNAGEL DE PAMPHILIS & HANSON (1969) beim Studium eines in einem Minimalmedium aerob

Tabelle 14: Ökonomische und molare Ertragskoeffizienten für verschiedene Mikroorganismen

Organismus	Temp. gruppe	T (C)	O ₂ -Bedarf	$Y_g \left(\frac{g}{g \text{ Gluc.}} \right)$	$Y_m \left(\frac{g}{Mol \text{ Gl.}} \right)$	Autor
Bacillus	thermo	45-60	aerob	0.43-0.42	~ 77.4	MATSCHKE & ANDREWS 1973
Zymomonas mobilis	meso	30	anaerob	0.044-0.023	7.95-4.09 medienabh.	BELAICH & SENEZ 1967
Clostridium thermo- aceticum	thermo	55	anaerob	0.22-0.28	40-50 medienabh.	ANDRESEN et al. 1973
Hansenula polymorpha	"thermo"	37-42	aerob	0.36 (auf Methanol)	-	LEVINE & COONEY 1973
Mischkultur	thermo	50-56	aerob	0.42 (auf Methanol)	-	SNEDECOR & COONEY 1974
Bacillus stearother- mophilus	thermo	55	aerob	0.34	61	COULTATE & SUNDARAM 1975
Escherichia coli	meso	23-37	aerob	0.26-0.25	47-45	MONOD 1942
Escherichia coli	meso	15-36	fak. an.	0.37	66.7	HARRISON & LOVELESS 1971

Fortsetzung Tabelle 14:

Organismus	Temp. gruppe	T (C)	O ₂ -Bedarf	$Y_g \left(\frac{g}{g \text{ Gluc.}} \right)$	$Y_m \left(\frac{g}{Mol \text{ Gl.}} \right)$	Autor
Escherichia coli	meso	30	aerob	0.5	90	NG 1969
Zymomonas mobilis	meso	> 30	anaerob	0.046	8.3	FORREST 1967
Aerobacter aerogenes	meso	30?	anaerob	0.145	26.1	HADJIPETROU et al. 1964
Pseudomonas fluorescens	meso	35	aerob	0.38	68.4	HERNANDEZ & JOHNSON 1967b
Aerobacter aerogenes	meso	30?	aerob	0.4	72.7	HADJIPETROU et al. 1964
Candida utilis	meso	35	aerob	0.51	91.8	HERNANDEZ & JOHNSON 1967b
Bacillus stearoether-mophilus	thermo	65	aerob	0.22	38.9	REILING 1976
Bacillus stearoether-mophilus	thermo	65	anaerob	0.13	23.4	REILING 1976
T.aquaticus	thermo	70	aerob	0.23	40.9	REILING 1976

wachsenden *B. subtilis*: sie beobachteten eine eingeschränkte Glucoseverbrauchsrate bei nachlassender Syntheseaktivität mit guter Kopplung ($\sim 80\%$). Die Autoren erklären ihre Befunde mit den unterschiedlichen Medienbedingungen im Vergleich zu FORREST (1967) und ROSENBERGER & ELSDEN (1960). Der von diesen untersuchte *Streptococcus faecalis* wuchs anaerob in einem Komplexmedium, in dem Glucose nur Energiequelle war, *B. subtilis* hingegen nutzte Glucose als Energie- und Kohlenstoffquelle. Im Komplexmedium soll aber der ATP-Bedarf für das Wachstum notwendigerweise eine Lockerung der Kopplung verursachen. HERNANDEZ & JOHNSON (1967a) untersuchten allerdings einen anaerob wachsenden *E. coli*-Stamm im Minimalmedium mit dem Ergebnis, daß bei ungünstigen Wachstumsbedingungen die ATP-Produktion schneller ablief als für die Zellsynthese nötig war, d.h. die katabolischen Prozesse wurden nicht von den Syntheseprozessen kontrolliert und reguliert.

Ausweichmöglichkeiten für einen Organismus in einer der beschriebenen Mangelsituationen (entstehende Nährstoffdefiziten, allgemein ungünstige Milieubedingungen, oder auch ungünstige Temperaturen (s. 4.3.3)) bzw. Konsequenzen der Entkopplung sind die Akkumulation von Reservestoffen und Intermediärprodukten und/oder die Abführung von zuviel produzierter Energie in Form von Wärme.

Auf die "physikalische Entkopplung" (Entkopplung als Temperatureffekt) wird unter (4.3.3) noch näher eingegangen. Wegen der Probleme, die der Glucosekohlenstoffeinbau ins Zellmaterial im Minimalmedium mit sich bringt und wegen der fehlenden Kenntnisse der Energieproduktion und -verteilung beim aeroben Organismenwachstum, halten GUNSALUS & SHUSTER (1961) und HERNANDEZ & JOHNSON (1967b) einen Bezug der Zellerträge auf den Sauerstoffverbrauch für den sinnvollsten Index der Effektivität des Glucoseabbaus bei Aerobiern. Zumal bei Bakterien fehlen praktisch noch sämtliche Hinweise

auf die Qualität der oxidativen Phosphorylierung. Aus zellfreien Extrakten hat man zwar P/O-Quotienten zwischen 0.4 und 1 bestimmt, aber man weiß nicht, ob der Phosphorylierungsmechanismus bei Bakterien tatsächlich so ineffektiv ist (theoretisch maximal möglich, wie an tierischen Mitochondrien auch experimentell verifiziert, wäre ein P/O-Verhältnis von 3), oder ob er bei der Präparation beschädigt worden ist. Bei *Gluconobacter liquefaciens* scheint Ineffizienz des Apparates vorzuliegen (HADJIPETROU et al. 1964).

Der konsumierte Sauerstoff nimmt im übrigen in vielen Fällen an der oxidativen Phosphorylierung gar nicht teil. Nach PAYNE (1970) wird der Sauerstoff für Hydroxylierungen und Spaltungen von Ringverbindungen ebenso gebraucht wie für Decarboxylierungen von Aminosäuren.

Wenn hier nun versuchsweise, obschon keine O₂-Aufnahme- und Verbrauchsdaten gemessen worden sind, der Ertrag der thermophilen Organismen pro g Sauerstoff berechnet werden soll, so ist das natürlich keine exakte, zweifelsfreie Bestimmung, sondern eher spekulativ, sie kann aber u.U. doch die Relationen zu den Ergebnissen mesophiler Organismen verdeutlichen.

Für *B. stearothermophilus* kann man bei 4 ml Mediummenge in verschlossenen RGSV einen Gesamtsauerstoffvorrat von etwa 4 mg voraussetzen, der rd. 4 mg Glucose zu oxidieren vermag. In NGCM 0.1/0.2 entstehen in diesem Fall 1.74 mg TG bei totalem Glucoseverbrauch (65 C). Aufgrund des linearen Zusammenhangs der TG-Produktion und des Glucoseverbrauchs bis zu 2 mg/ml (Abb. 25- 27, B) soll angenommen werden, daß der vorhandene Sauerstoff hierfür total aufgebraucht ist. Aus 1.74 mg TG/ 4 mg O₂ errechnet sich eine Ausbeute pro g Sauerstoff von 0.43 g Trockengewicht. Das ist bedeutend weniger, als aerobe mesophile Mikroorganismen in Komplex- oder Minimalmedium produzieren: nach HERNANDEZ & JOHNSON (1967b) ist der

auf den Sauerstoff bezogene Ertrag (g TG/g O₂) für *Aerobacter cloacae* 0.8, für *E. coli* 0.74, für *Pseudomonas lindneri* 0.95, für *Saccharomyces carlsbergensis* 0.95 und für *Candida utilis* 1.26. Das hier errechnete Ergebnis bestätigt die Untersuchungen von POZMOGOVA et al. (1974) in der Tendenz: dort war bei thermophilen Organismen ein gegenüber mesophilen Organismen doppelt so hoher O₂-Verbrauch pro g gebildeten Trockengewichts festgestellt worden. Größenordnungsmäßig stimmt aber auch der "thermophile" *B. stearothermophilus*-Ertrag mit den zitierten "mesophilen" Erträgen überein. Der absolut kleinere Wert von *B. stearothermophilus* deutet auf eine geringere Effektivität des aeroben Abbaus bei hohen Temperaturen hin (Entkopplung Atmungskette-oxidative Phosphorylierung oder Entkopplung Katabolismus-Anabolismus).

Die auf den Glucoseverbrauch bezogenen Erträge von *B. stearothermophilus* sind im Vergleich zu vielen anderen Daten untere Grenzwerte, denn beim Wachstum im Komplexmedium dient Glucose, wie bereits erwähnt, häufig einzig und allein als Energiequelle. Daher sind die meisten in der Literatur angeführten Wirkungsgrade nur auf den Energielieferanten Glucose und nicht auf den C-Lieferanten bezogen.

Wenn man nun davon ausgeht, daß eine Bakterienzelle zu 50 % aus Kohlenstoff besteht, Glucose aber nur zu 40 %, so wird das 1.25fache der TG-Produktion an Glucose-C-Atomen im Minimalmedium für Biosynthesezwecke verwendet. Das bedeutet z.B. für *B. stearothermophilus* (65 C, 38.9 g TG/Mol Glucose), daß 38.9 · 1.25 g Glucose pro Mol verbrauchter Glucose ins Zellmaterial eingeschleust werden, d.h. 48.63 g Glucose gehen von 1 Mol für Syntheseleistungen verloren, können also nicht mehr über die Atmungskette zur Energieproduktion herangezogen werden. Damit werden die 38.9 g Trockengewicht aber nicht mehr von 1 Mol Glucose, sondern nur von (180 - 48.63)/180 = 0.73 Mol der Energiequelle produziert, wenn man von

der Energieproduktion des anaeroben Weges bis zum Citronensäurezyklus absieht, aus dem ja erst die C-Fragmente zur Synthese entnommen werden. Dementsprechend werden dann ~ 53.3 g TG/Mol Glucose gebildet. Dies ist ein oberer Grenzwert für den Ertrag, weil ja die ATP-Produktion bis zum Citronensäurezyklus unberücksichtigt geblieben ist. Der reale, mit den Daten in der Literatur vergleichbare Wert sollte also zwischen 38.9 und 53.3 g TG/Mol Glucose liegen.

Eine solche Verrechnung mit in die Zelle eingebautem Glucosekohlenstoff ist eigentlich nur dann gestattet, wenn außer CO_2 keine Stoffwechselprodukte im Medium vorhanden sind (GUNSALUS & SHUSTER 1961). Eine ähnliche Berechnung für *T.aquaticus* erscheint nicht gerechtfertigt, da sie absolute Spekulation darstellen würde ohne jedwede experimentelle Absicherung. In den wenigsten Experimenten war die angebotene Glucosekonzentration von 0.1 % völlig verbraucht, und über Verbleib und Verteilung der Glucose hinsichtlich Baumaterial für Zellsubstanz und/oder ATP-Erzeugung kann nichts ausgesagt werden (s. auch 3.5.2).

Wenn man, wie von einigen Autoren berichtet, für den Energieertragskoeffizienten Y_{ATP} (g TG pro Mol gebildetes ATP) für aerob wachsende Organismen 10 - 11 ansetzt, was eine gleiche Effizienz der ATP-Verwertung für aerobe und anaerobe Organismen bedeutet (Literatur dazu bei PAYNE 1970), erhält man bei einem molaren Ertrag von 53.3 eine ATP-Produktion beim *B.stearothermophilus*-Wachstum von $Y_m/Y_{\text{ATP}} = 5$, also 5 Mole ATP, ein Wert, den auch STORCK & STANIER (nach GUNSALUS & SHUSTER 1961) für MONOD's (1942) Untersuchungen an *E.coli* erhielten.

Diese Art der ATP-Berechnung muß aber doch als recht zweifelhaft angesehen werden.

Entsprechende Umrechnungen lassen sich natürlich auch für die anderen getesteten Wachstumstemperaturen durchführen, sollen hier aber wegen der Unsicherheit über die Korrektheit des Verfahrens unterbleiben. Für den 65 C-Fall ist dies nur deshalb unternommen worden, um den Weg (und gleichzeitig die Problematik) anzudeuten, auf dem man sich u.U. einigermaßen realistischen Werten für aerobe Zellerträge und ATP-Produktionszahlen nähern könnte.

Der anaerobe Wirkungsgrad von *B.stearothermophilus* scheint keine besonderen Differenzen zu den Daten mesophiler Organismen zu enthüllen. Man könnte versucht sein, die errechneten 23.4 g TG/Mol Glucose (65 C) als Bestätigung des für anaerobes Wachstum bestimmten, weithin gültigen Energieertragskoeffizienten $Y_{ATP} = 10.5$ g TG/Mol gebildetes ATP anzusehen (hier also $Y_{ATP} = 11.7$ g TG/Mol ATP). Wegen der Umwandlung von Glucosekohlenstoff in Zellmaterial erfährt dieser Wert nämlich keine Korrektur nach oben, da die Energieproduktion im anaeroben Fall vor Eintritt in die Syntheseprozesse bereits abgelaufen sein sollte. Wie sich anhand der Kalorimeterexperimente zeigt, setzt der von *B.stearothermophilus* beschrittene anaerobe Abbauweg aber sehr viel mehr Energie frei als die Glykolyse, für die das $Y_{ATP} = 10.5$ für viele Organismen bestimmt worden ist.

Dieses Y_{ATP} ist entgegen der Ansicht vieler Autoren (z.B. BAUCHOP & ELSDEN 1960 oder Review-Artikel von PAYNE 1970) keine mikrobielle Konstante, wie STOUTHAMER & BETTENHAUSEN (1973) nachgewiesen haben und scheint für *B.stearothermophilus* unter Beachtung der experimentell nachweisbaren Energie (Wärme- und TG-Produktion) sehr kleine Werte anzunehmen (Größenordnung 2 g TG/Mol ATP; abgeschätzt nach: experimentell unter anaeroben Bedingungen bei 65 C für *B.stearothermophilus* nachweisbar ~ 53 % von 2872 kJ ($\hat{=}$ Energieinhalt von 1 Mol Glucose), Glykolyse erreicht nur ~ 7.6 %; daraus folgt $53/7.6 \approx 7$ mal größere Energiefreisetzung bei

B.stearothermophilus gegenüber Glykolyse, und damit 11.7 g TG : 7 = 1.7 g TG/Mol ATP)).

Das könnte wieder als Hinweis auf reduzierte Effizienz des Glucosemetabolismus bei hohen Temperaturen, d.h. auf physikalische Entkopplungsprozesse verstanden werden. Dazu später mehr (Kap. 4.3.3).

Aus Tabelle 15 ist schon zu entnehmen, daß unter aeroben Bedingungen stets mehr Trockengewicht gebildet werden kann als unter anaeroben. Diese Tendenz hatte sich ja auch aus den O₂-Bedarfsuntersuchungen für B.stearothermophilus ergeben, und erklärt sich natürlich einfach dadurch, daß aerober Substratabbau eben prinzipiell mehr Energie für Syntheseprozesse zur Verfügung stellt als anaerober. HARRISON & LOVELESS (1971) haben für E.coli und Klebsiella aerogenes Zellerträge bestimmt unter Bedingungen mit O₂-Überschuß, O₂-Mangel und O₂-Abwesenheit und erhielten eine den B.stearothermophilus-Resultaten entsprechende Tendenz: für beide Organismen fiel die Ausbeute mit fallendem O₂-Angebot. Ähnliches gilt für die Untersuchungen von HADJIPETROU et al. (1964). Sie verglichen die Erträge von Aerobacter aerogenes für aerobes und anaerobes Wachstum. Es zeigte sich ein fast 3fach gesteigerter Ertrag unter aeroben gegenüber anaeroben Bedingungen ($Y_m = 72.7$ bzw. 26.1).

4.3.3 Temperaturabhängigkeit des Ertrages

Schon MONOD (1942) beobachtete an E.coli fallenden Wirkungsgrad mit steigender Temperatur, und zwar war der Ertrag im Bereich 23 - 27 C fast konstant, nahm dann aber rapide ab bei einer Temperatursteigerung auf 41 C (Verlust 25 %). Ähnliche Effekte sind auch anderswo berichtet worden (Literatur bei MATSCHE & ANDREWS 1973) und werden mit gesteigertem Energiebedarf für Betriebsstoffwechsel oder Organismen-

schädigung bzw. -abtötung bei höheren Temperaturen erklärt (dynamische Theorie!). Entkopplung von Katabolismus und Anabolismus wäre eine weitere Interpretationsmöglichkeit für eine temperaturabhängige Veränderung der Ertragskoeffizienten. Die normalerweise für die Zellsynthese verwendete Energie könnte dazu benutzt werden, Reservestoffe anzulegen (Glykogen, Lipide, Polypeptide) oder aber als Wärme dissipiert werden. Es muß aber - zumindest bei Aerobiern - auch die Möglichkeit von Entkopplungsprozessen zwischen Elektronentransport über die Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung in Betracht gezogen werden, woraus ebenfalls verstärkte Wärmeabgabe resultieren würde.

MATSCHKE & ANDREWS (1973) fanden für einen thermophilen *Bacillus* über einen 15 C-Temperaturbereich von 45 - 60 C allerdings keine Verringerung des Ertrages. NG (1969) beobachtete an *E. coli* zwischen 35 und 18 C ebenfalls keinen Ertragswechsel, unterhalb 18 C jedoch eine Abnahme. Er führt diese Veränderung auf den Einfluß der veränderten (reduzierten) Wachstumsrate zurück, wovon weiter oben schon einmal die Rede war (4.3). Der verringerte Ertrag geht bei NG (1969) Hand in Hand mit einer verstärkten Akkumulation von Speicherstoffen.

SENEZ' (1962) Untersuchungen an *A. aerogenes* demonstrieren ebenso einen Temperaturbereich relativ konstanten Ertrages (23 - 37 C) und danach einen starken Abfall bis 41 C. HARRISON & LOVELESS (1971) finden dagegen keine Ertragsreduktion im Bereich von 15 - 36 C für aerob wachsende *E. coli*-Kulturen und schließen daraus auf temperaturunabhängige Energiebedürfnisse des studierten Organismus in einem weiten Temperaturbereich.

Für die in dieser Arbeit untersuchten Organismen muß eine leicht veränderte Tendenz angegeben werden: *B. stearothermophilus*-Erträge fallen - allerdings nicht stark - mit steigender Temperatur kontinuierlich, die *T. aquaticus*-Erträge sind für 65, 70 und 75 C einigermaßen konstant, der 60 C-Wert liegt niedriger. Gerade aber beim Wachstum von

von *T.aquaticus* sind die Fehler recht groß, so daß es gerechtfertigt erscheint, für diesen Organismus von 60 - 75 C konstante Erträge anzunehmen.

Eine sehr viel drastischere Abnahme des Ertrages mit der Temperatur fanden COULTATE & SUNDARAM (1975) für ihren thermophilen *B.stearothermophilus*-Stamm. Von 40 bis 60 C bestimmten sie molare Ertragsvariationen (Y_m -Werte) von 90 (40 C) über 72 (50 C) und 54 (60 C) bis 0 (62 C). Auch dort liegen also wie beim hier untersuchten *B.stearothermophilus*-Stamm Optimaltemperatur des Ertrages und der Vermehrung (COULTATE & SUNDARAM : 55 C) weit auseinander. Die genannten Autoren interpretieren ihre Resultate als zunehmende Ineffizienz in der Koordination nichtoxidativer und oxidativer Prozesse beim Glucosemetabolismus bei höheren Temperaturen oder als eine mögliche Entkopplung der Energieproduktion von der Atmung. Einen erhöhten "Turnover" konnten sie nicht feststellen.

Somit kommen als Ursachen der reduzierten *B.stearothermophilus*-Erträge mit steigender Temperatur (Abb. 24) folgende Wirkungsmechanismen in Frage: Entkopplungsprozesse zwischen Katabolismus und Anabolismus, zwischen Elektronentransport über die Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung, zunehmende Zerstörung der Membranstrukturen, an denen ja die oxidative Phosphorylierung abläuft (Stichworte: Membrantheorie, Lipidtheorie), verschlechterte Koordination der einzelnen Stoffwechselphasen oder allgemein zunehmende Schädigung des Gesamtorganismus bzw. einzelner Zellbestandteile (Stichwort: dynamische Theorie). Dabei ist das Zusammenspiel mehrerer der genannten Faktoren nicht auszuschließen.

Für die Ertragskonstanz von *T.aquaticus* könnte zutreffen, daß bei 75 C noch nicht der von SENEZ (1962) erwähnte "kritische Temperaturbereich" erreicht ist, in dem - bei gleichbleibender

katabolischer Aktivität - Wachstumsrate und Ertrag simultan fallen, was einer Energieentkopplung gleichkäme. Es mag durchaus sein, daß dieser Bereich unmittelbar oberhalb 75 C einsetzt und sich bis zur Maximaltemperatur (78/81 C) erstreckt.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß der untersuchte *B.stearothermophilus*-Stamm die vielfach registrierte Temperaturabhängigkeit des Wachstumsertrages zeigt (aerob wie anaerob), was auf steigende Entkopplungs- und Koordinationsprobleme einzelner Stoffwechselschritte mit der Temperatur oder aber verstärkte Organismenschädigung zurückzuführen sein könnte. Für *T.aquaticus* scheint ein Temperaturbereich konstanter Ausbeute zu existieren, was ebenfalls für verschiedene mesophile und thermophile Organismen beschrieben wurde, und was durch eine gleichbleibende, temperaturunabhängige Kopplung zwischen abbauenden energieliefernden und synthetisierenden energieverbrauchenden Reaktionen erklärbar wäre.

Darüber hinaus wird erkennbar, daß die unkorrigierten Erträge für beide Organismen im Vergleich zu den Daten mesophiler Organismen (abgesehen von MONOD's (1942) *E.coli*-Werten) doch deutlich kleiner sind, ein Indiz für stärkere Entkopplungsvorgänge oder gestörte Wachstumsprozesse bei hohen Temperaturen und damit u.a. auch als Hinweis auf die dynamische Theorie zu verstehen, nach der ja geringere Erträge beim thermophilen Wachstum zu erwarten sind, da laufend Zellmaterial ersetzt oder erneuert werden muß.

Die absoluten Erträge von *B.stearothermophilus* und *T.aquaticus* sind auch geringer als diejenigen, die von anderen thermophilen Bakterien berichtet werden, und die als vereinbar mit den mesophilen Ausbeuten zu betrachten sind.

Wenn man allerdings die korrigierten B.stearothermophilus-Werte zum Vergleich heranziehen würde, gäbe es zu COULTATE & SUNDARAM's (1975) und MATSCHE & ANDREWS' (1974) Untersuchungen keine großen Differenzen, zumal die hier studierten Temperaturen z.T. deutlich diejenigen der genannten Autoren übertreffen.

Die beim anaeroben B.stearothermophilus-Wachstum gegenüber mesophilen Organismen scheinbar verbesserten Erträge (zumindest bei 50, 55 und 60 C) müssen unter dem Aspekt sehr viel größerer Energiefreisetzung des anaeroben B.stearothermophilus-Stoffwechsels gesehen werden, so daß auch hier prinzipiell eine schlechtere Ertragslage zu registrieren ist.

4.4 Energetische Bilanz und Wärmeproduktion beim Wachstum

Für jedes Organismenwachstum muß die von MOROWITZ (1970) aufgestellte Beziehung gelten:

$$\text{nutrients} \longrightarrow \text{cells} + \text{waste products},$$

wobei die "waste products" noch einmal aufgeteilt werden können in dissipierte Wärme und im Medium akkumulierte Stoffwechselprodukte. Die obige Beziehung kann sowohl als Material- als auch als Energiebilanz interpretiert werden.

Bei Entkopplungsvorgängen oder Umschaltungen auf andere Abbauwege während des Wachstums verändern sich pro Substrateinheit die jeweiligen Anteile der beiden Größen auf der rechten Seite der Gleichung: es wird relativ weniger Zellmaterial produziert, und der Anteil der "waste products" nimmt zu.

Ein solcher Fall tritt offensichtlich beim B.stearothermophilus-Wachstum in Medien höherer Glucosekonzentration

(≥ 0.3 %) bei O_2 -Limitierung auf: der Ertrag sinkt gegenüber den "Normalbedingungen" (NGCM 0.1/0.2) für jede Temperatur um rund 25 % (s. Abb. 25 - 27, A). Was geschieht nun mit den "waste products"?

Aus der Abweichung vom linearen Verlauf in Abb. 25-27, B oberhalb 2 mg Glucose/ml geht hervor, daß Sauerstoffmangel bzw. -abwesenheit den Wachstumsertrag von *B.stearothermophilus* beeinflusst. Wenn man annimmt, daß der vorhandene Sauerstoff in dieser Situation (ab 2 mg/ml) total verbraucht ist (ein Ansatz, der auch der Ausbeutenberechnung pro g O_2 zugrundegelegt wurde (s. 4.3.2)), kann der bei höheren Glucosekonzentrationen beobachtete Glucoseverbrauch nur über anaerobe Abbauprozesse ablaufen, was mit einer abnehmenden Wachstumsrate des Organismus verknüpft ist.

Da diese Prozesse aber eine geringere Effektivität des Substratabbaus nach sich ziehen (s. Vergleich aerob - anaerob in Abb. 24 oder Tab. 10 und 15), wird der reduzierte Ertrag

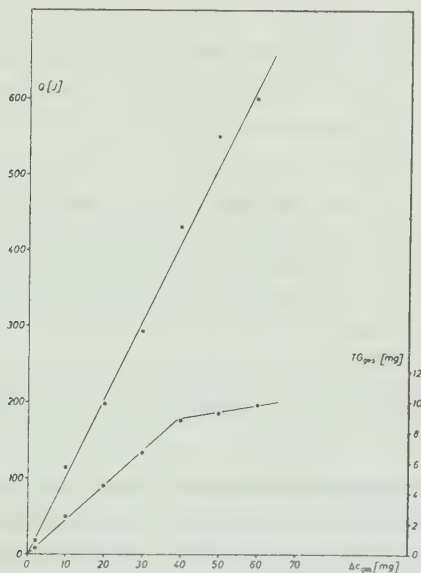


Abb. 44: Gesamtwärmeproduktion (■) und Gesamttrockengewichtsproduktion (●) beim Wachstum von *B.stearothermophilus* als Funktion des Gesamtglucoseverbrauchs bei 65 °C

bei den höheren Glucosekonzentrationen verständlich. Dieser "zusätzliche" (anaerobe) Glucoseverbrauch liegt für alle höheren Glucosekonzentrationen bei maximal ~ 1 mg/ml, d.h. es ist in verschlossenen Reaktionsgefäßen ein Gesamtverbrauch von maximal ~ 3 mg/ml (für sämtliche Konzentrationen) zu beobachten. Der "zusätzliche" Glucoseverbrauch (~ 1 mg/ml) entspricht im übrigen in etwa dem Glucoseabbau unter Stickstoffatmosphäre (er liegt ein wenig darüber). Da nun

- a) die Wärmeproduktion des anaeroben Glucoseabbaus nur ~ 6.2 kJ/g beträgt gegenüber ~ 10.2 kJ/g bei aerobem Verbrauch (Tab. 10)
- b) die Wärmeproduktion als Funktion des Glucoseverbrauchs aber linear bis ~ 3 mg/ml ($\hat{=}$ 60 mg Gesamtglucoseabbau) mit ~ 10 kJ/g Glucose ansteigt (Abb. 44)

könnte man annehmen, daß die im Vergleich zum aeroben Abbau "fehlenden" 4 kJ/g durch ATPase-Einwirkung (Spaltung des zuviel produzierten ATP unter Freisetzung von Wärme) erbracht werden.

Gleichzeitig werden - wegen des anaeroben Abbaus - Stoffwechselprodukte im Medium akkumuliert.

Ein intensiver Betriebsstoffwechsel mit starkem Glucoseverbrauch und beträchtlicher Wärmeproduktion könnte allerdings auch als Erklärung für die beobachteten Phänomene (reduzierter Ertrag, linear ansteigende Wärmeproduktion bis zu einem Glucoseverbrauch von ~ 3 mg/ml) herangezogen werden. Dagegen muß aber eingewandt werden, daß

- a) bei den höheren Konzentrationen stets mehr Trockengewicht gebildet wird als bei 0.2 % Glucose, also noch Wachstum stattfindet
- b) die Thermogramme des Wachstums von *B. stearothermophilus* bei höheren Glucosekonzentrationen eigentlich keine Veranlassung bieten, einen signifikanten Betriebsstoffwechsel anzunehmen (s. Abb. 35)

Beim O_2 -limitierten *B.stearothermophilus*-Wachstum erhält man also eine verringerte Ausbeute pro Substrateinheit, eine reduzierte Wachstumsrate sowie eine verstärkte extrazelluläre Akkumulation von Intermediärprodukten und eine verstärkte Wärmeproduktion pro g gebildeten Trockengewichts.

Bei ausreichendem O_2 -Angebot sollten diese Effekte nicht auftreten, wie auch experimentell bei höheren Glucosekonzentrationen - allerdings nur für den Ertrag - nachgewiesen werden konnte (s. 3.5.1.4). Dementsprechend erhielten ZABLOCKI et al. (1967) bei Untersuchungen an aeroben *E.coli*-Kulturen (ständige Belüftung) eine konstante Kopplung über einen Glucosekonzentrationsbereich von 0.05 - 1.0 % (linearer Zusammenhang zwischen TG- und Wärmeproduktion, da gleichbleibender Ertrag und gleichbleibende Wärmeproduktion pro g verbrauchter Glucose über den ganzen Konzentrationsbereich). Allerdings entsprach der Glucoseverbrauch bei einer Glucosekonzentration von 1 % nur 1.2 mg/ml, bei einer angebotenen Konzentration von 0.5 % nur 1.4 mg/ml. Das aber sind Glucoseverbrauchswerte, für die auch in dieser Arbeit der lineare Zusammenhang zwischen Wärme- und TG-Produktion einerseits und Glucoseverbrauch andererseits bzw. zwischen Wärmeproduktion und TG-Produktion gültig ist.

Eine gleichbleibende Kopplung wird bei den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchsbedingungen stets bis zu einer Glucosekonzentration von 0.2 % erreicht (bei 4 ml Mediummenge in den RGSV bzw. bei 20 ml in den Kalorimeterkammern).

Bei Energie- und Kohlenstoffüberschuß (wie im Falle von Glucosekonzentrationen ≥ 0.3 %) bildet sich bei der Vermehrung von *B.stearothermophilus* eine charakteristische Thermogrammform aus: in einer zweiten intensiven Wachstumsphase werden das Substrat und eventuell ausgeschiedene Stoffwechsel-

produkte mit beträchtlicher Wärmeproduktion in Trockengewicht umgesetzt, was BOIVINET (1964) bei *A.aerogenes* nicht entdecken konnte. Dort wurde zwar ebenfalls sekundärer Wärmeausstoß beobachtet; er war jedoch nicht mehr mit Organismenwachstum korreliert.

Nur genaue biochemische Analysen könnten im Falle von *B.stearothermophilus* präzisieren helfen, welche physiologischen Vorgänge sich im einzelnen bei Substratabbau und -ausnützung abspielen.

Interessant ist der direkte Abfall des Wärmefflusses von *B.stearothermophilus* nach dem ersten Hauptmaximum unter N_2 -Bedingungen. Normalerweise wird ein solcher Abfall mit Substraterschöpfung in Verbindung gebracht. Das trifft hier mit Sicherheit nicht zu, denn es konnte stets noch Glucose im Medium nachgewiesen werden. Es mag daher sein, daß beim anaeroben Abbau nach einer bestimmten Konzentration irgendwelcher unbekannter Stoffwechselprodukte weiteres *B.stearothermophilus*-Wachstum sehr plötzlich unmöglich wird, ähnlich der Einwirkung chemischer Agenzien auf lebende Zellen, bei der erst von einer ganz bestimmten Dosis an die spezifische Wirkung einsetzt.

PAYNE (1970) gibt unter Benutzung einer Verbrennungswärme von 22.2 kJ/g TG und einem molaren Ertrag von 75.4 g/Mol Glucose für in Minimalmedium gewachsene aerobe Bakterien einen Energiegehalt von ~ 1670 kJ im Trockengewicht pro Mol Glucose an. Das entspricht einer Energiespeicherung von rund 60 % und ist fast identisch mit dem 55 - 65 %igen Einbau von Substratkohlenstoff, der von *E.coli* (SIEGEL & CLIFTON 1950), *A.aerogenes* und *A.cloacae* (HERBERT 1958, HERBERT et al. 1956, alle zitiert nach PAYNE 1970) vorgenommen wurde.

Allerdings liegen die C-Inkorporationswerte, die COULTATE & SUNDARAM (1975), MONOD (1942), HADJIPETROU et al. (1964) oder ZABLOCKI et al. (1967) ermittelten, nur zwischen 20

und 50 %. Wie aus Tabelle 15 hervorgeht, erhält man für den hier untersuchten *B.stearothermophilus* in NGCM 0.1/0.2 je nach Temperatur Glucose-C-Einbauquoten von

Tabelle 15: Glucose-C-Einbau ins Zellmaterial und Energiespeicherung im Trockengewicht von *B.stearothermophilus*

Temperatur (C)	50	55	60	65	70
aerob:					
C-Einbau (%)	31.4	29.8	26.6	27.0	26.1
Energiespeich. in TG (%)	28.0	26.5	23.8	24.1	23.3
anaerob:					
C-Einbau (%)	22.9	20.3	16.5	15.9	13.4
Energiespeich. im TG (%)	20.4	18.1	14.7	14.2	12.0

31.4 - 26.1 % (pro Substrateinheit) unter aeroben Bedingungen und 22.9 - 13.4 % unter anaeroben Bedingungen.

Die Energiespeicherung im Trockengewicht liegt für *B.stearothermophilus*, bezogen auf aeroben Glucoseabbau (2872 kJ/Mol), je nach Temperatur zwischen 28 und 23 % (aerob) und zwischen 20 und 12 % (anaerob).

Die aeroben Werte sind zwar untere Grenzen, wie in (4.3.2) dargelegt, dennoch wird deutlich, daß nicht übermäßig viel der verfügbaren Energie vom thermophilen Organismus genutzt wird, eine Folge der bereits erwähnten physikalischen Entkopplungsprozesse, erschwelter Wachstumsabläufe oder verschlechterter Koordination der verschiedenen Phasen des Stoffwechsels. Die ungenutzte Energie muß als Wärme oder

exkretierte Intermediärprodukte wieder auftauchen. Das ist für aerobes Wachstum von *B.stearothermophilus* auch der Fall. Die bei jeder Temperatur fehlenden 10 % der Gesamtenergiebilanz (s. Tab. 10) müssen dabei auf die unterschiedlichen Stoffwechselprodukte entfallen.

Die beim anaeroben Wachstum nachweisbare Energie von mindestens 61 - 51 % der vorhandenen Energie läßt auf einen eigentlich sehr produktiven Abbauweg schließen, der aber, wie man sieht, vielleicht oder vermutlich als Folge der hohen Temperaturen, nur sehr dürftig genutzt wird. Gerade im anaeroben Fall ist ja die Effektivitätsabnahme der Energieausnutzung mit der Temperatur besonders deutlich (Tab. 15). Für *T.aquaticus* läßt sich, wie gesagt, der Glucosekohlenstoffeinbau in Zellmaterial nicht bestimmen. Unter der Annahme der gleichen Zellzusammensetzung in YE 0.1/Glucose 0.1 und YYGM 0.1/0.1/0.1 läßt sich aber mit der Verbrennungswärme von 19.46 kJ/g TG eine Energiespeicherung im Trockengewicht von *T.aquaticus* von 24.4 % (60 C) bis 29 % (75 C) berechnen (siehe Tab. 16), also in etwa der *B.stearothermophilus*-Speicherkapazität entsprechend.

Tabelle 16: Energiespeicherung im Trockengewicht von *T.aquaticus*

Temperatur (C)	60	65	70	75
Energieäquivalent TG/ Δc (kJ/g Gluc.)	3.89	4.46	4.42	4.63
Energiespeich. im TG (%)	24.4	28.0	27.7	29.0

Für die Wärmeproduktion ergeben sich bei *B.stearothermophilus* temperaturunabhängige Werte von ~ 10.2 kJ/g Glucose (aerob) bzw. ~ 6.2 kJ/g (anaerob) (Tab. 10). Das zeigt eine stärkere

Stoffwechselaktivität unter aeroben Verhältnissen an, wie ja auch zu erwarten ist. Die Temperaturunabhängigkeit der Werte bedeutet gleiche katabolische Aktivität für alle untersuchten Temperaturen. Wegen des mit der Temperatur abnehmenden materiellen Wirkungsgrades oder anders gesagt: wegen zunehmender Entkopplungsprozesse bzw. Zerstörung und Neusynthese von Zellkomponenten nimmt gemäß der MOROWITZ'schen (1970) Beziehung (s. Anfang 4.4) die Wärmeproduktion pro g Trockengewicht im großen und ganzen mit der Temperatur zu, sowohl unter aeroben wie anaeroben Bedingungen, d.h. man erhält sich verschlechternde Effektivität des Substratabbaus mit der Temperatur. Die Unterschiede in den Sauerstoffverhältnissen machen sich hierbei kaum bemerkbar. Für beide Abbaumechanismen scheint sich der gleiche temperaturabhängige Entkopplungsgrad einzustellen, so daß bei jeder Temperatur auch etwa gleichgroße Beträge durch Wärmeabgabe pro TG-Einheit verlorengehen.

Diese Aussagen gelten nicht für *T.aquaticus*. Bei *T.aquaticus* hat man zwar wie bei *B.stearothermophilus* die Temperaturunabhängigkeit der Wärmeproduktion pro g verbrauchter Glucose (~ 11.7 kJ/g im Bereich 65 - 75 C), darüber hinaus aber auch die Konstanz (oder sogar einen leichten Anstieg) des materiellen Ertrages. Das bedeutet, daß beim *T.aquaticus*-Wachstum nicht von verringerter Effizienz des Substratabbaus mit steigender Temperatur gesprochen werden kann. Vielleicht deutet sich hier ein zu den *B.stearothermophilus*-Vorgängen unterschiedlicher "Thermophiliemechanismus" an.

Allerdings beträgt der bei *T.aquaticus* studierte Temperaturbereich nur 10 C, ist also für weitergehende Schlußfolgerungen vermutlich doch zu begrenzt.

In Tabelle 17 sind nun für eine Anzahl verschiedener aerober und anaerober Mikroorganismen die materiellen Wirkungsgrade, die Wärmeproduktion pro g Trockengewicht und pro Mol Glucose angegeben. Wenn man beispielsweise die aeroben

B.stearothermophilus- und T.aquaticus-Ergebnisse mit denjenigen von E.coli (ERIKSSON & HOLME 1973) vergleicht, sieht man, daß bei E.coli ca. 28 %, bei B.stearothermophilus dagegen ~64 % und bei T.aquaticus sogar ~74 % an Wärme verlorengehen, was in das Bild der schlechteren Substratausnutzung bei erhöhten Temperaturen paßt.

Zur Temperaturabhängigkeit der Wärmeproduktion pro g Glucose und pro g Trockengewicht liegen in der Literatur noch nicht viele Daten vor. LAMPRECHT (1969) erhielt bei Wachstumsuntersuchungen an S.cerevisiae für verschiedene Temperaturen stets die gleiche Gesamtwärmeabgabe, mit fallendem Endtiter bei steigender Temperatur, also steigende Wärmeproduktion/Zelle. Da die Ergebnisse aber auf die Zellzahl bezogen sind und nicht auf das Trockengewicht, die Zellen zudem mit der Temperatur Gestalt und Struktur und damit ihre Masse verändern können (s. Kapitel 4.2), sind sie nur schwer mit den hier erhaltenen Werten vergleichbar.

In einer anderen Arbeit (LAMPRECHT et al. 1974) wird von einer zu den hier vorliegenden Untersuchungen unterschiedlichen Tendenz berichtet: während bei B.stearothermophilus und T.aquaticus eine Konstanz der Q/Glucose-Werte zu beobachten ist, ergibt sich dort - mit ebenfalls einem B.stearothermophilus - steigende Wärmeproduktion pro g Glucose mit der Temperatur.

Die Konstanz der Werte bedeutet gleiche katabolische Aktivität (gleicher energetischer Wirkungsgrad des Glucoseabbaus) bei allen Temperaturen, eine Steigerung der Werte entspricht einer Steigerung der Ineffizienz des Abbaus, oder zunehmender Stoffwechselaktivität. Allerdings ist bei LAMPRECHT et al. (1974) bei der Maximaltemperatur die Wärmeproduktion pro g verbrauchter Glucose schon wieder reduziert, so daß kein einheitliches Bild entsteht.

Die Temperaturunabhängigkeit der Werte läßt sich zusammen mit dem reduzierten Ertrag (nur B.stearothermophilus!) leicht mit

Tabelle 17: Ökonomischer Ertrag Y_g , Wärmeproduktion/TG und Wärmeproduktion/Glucose für verschiedene Mikroorganismen

Organismus	Temp. (C)	Y_g (mg/g)	Q/TG (kJ/g)	Q/ Δc (kJ/Mol)	Autor
aerob:					
Escherichia coli	27			818	ERIKSSON & HOLME (1973)
B.stearothermophilus	50-70	251-209	41-49	1836	REILING (1976)
T.aquaticus	65-75	224-243	~ 50	2106	REILING (1976)
anaerob:					
B.stearothermophilus	50-70	183-107	36-58	1116	REILING (1976)
Zymomonas mobilis	30?	36	21	137	BELAICH et al. (1968)
Saccharomyces cerevisiae	30?	126	5.7	129	BELAICH et al. (1968)
Saccharomyces cerevisiae	30		3.6	83	LAMPRECHT (1969)
Escherichia coli	30	164	4	118	BELAICH et al. (1971)
Aerobacter aerogenes	37	100	6.3	113	BOIVINET (1964)
Streptococcus faecalis	37	110	6.1	121	BOIVINET (1964)
B.stearothermophilus	65	138	5.7	142	LAMPRECHT et al. (1974)

Entkopplungsprozessen (Katabolismus wird nicht vom Anabolismus kontrolliert und reguliert) oder auch mit der dynamischen Theorie (zunehmende Zerstörung/Synthese von Zellkomponenten mit der Temperatur sorgt für immer ineffizienteren Substratabbau) in Verbindung bringen.

Die für *T.aquaticus* erhaltenen Ergebnisse bieten dagegen kein schlüssiges Bild: der gleichen katabolischen Aktivität in einem bestimmten Temperaturbereich stehen gleichgroße oder -gute Syntheseleistungen gegenüber (u.U. sogar noch leicht verbessert mit steigender Temperatur). Hier liegt also keine Temperaturentkopplung vor, und die dynamische Theorie kann ebenfalls nicht zur Erklärung herangezogen werden.

4.5 Hitzeresistenz

Die in Abb. 39 gezeigten Temperaturinaktivierungskurven von *T.aquaticus* zeigen in Abhängigkeit von der Einwirkzeit für jede Behandlungstemperatur eine Kinetik erster Ordnung nach dem Schema:

$$- \frac{dN}{dt} = k \cdot N,$$

d.h. die Abtötungsrate ist der jeweiligen vorhandenen lebensfähigen Keimzahl proportional oder anders gesagt: in gleichen Zeitintervallen wird der gleiche Prozentsatz lebensfähiger Zellen abgetötet.

Dieser Abtötungsverlauf ist in vielen Untersuchungen bestätigt worden (s. z.B. FARRELL & ROSE 1967a, PRECHT et al. 1955, CHRISTOPHERSEN 1973).

Die Proportionalitätskonstante k in obiger Formel hängt von verschiedenen Faktoren ab, z.B. der Behandlungs- und Züchtungstemperatur, dem pH, dem Alter der Kultur (exponentiell wachsende Zellen sind am hitzesensibelsten), der

Ionenkonzentration, dem Wassergehalt (je weniger Feuchtigkeit, desto resistenter), Schutzstoffen in Form von Proteinen, Kohlenhydraten, Ölen oder Fetten oder auch der Dichte der Zellpopulation.

Die Abtötungskurven in Abb. 39 repräsentieren einmal eine Zeitabhängigkeit (formelmäßig oben angegeben), zum anderen eine Temperaturabhängigkeit. Diese Temperaturabhängigkeit der Absterbereaktion kann in vielen Fällen ebenfalls als eine Reaktion erster Ordnung durch eine Exponentialfunktion beschrieben werden.

Es werden aber auch Abweichungen vom linearen Verlauf erwähnt (FARRELL & ROSE 1967a, PRECHT et al. 1955, CHRISTOPHERSEN 1973). Dabei kann die Abtötungskinetik konvexe oder konkave Form annehmen. (Versuchte Erklärung durch Annahme unterschiedlicher Hitzeresistenz der Zellen in der Population (konkav) bzw. von Klumpungseffekten der Organismen (konvex)).

Die Abtötungskinetiken von *B.stearothermophilus* (Abb. 40) zeigen ein anderes Verhalten. Nach einem anfänglich steilen Abfall der Überlebendenzahl verringert sich auch bei steigender Behandlungstemperatur die Abtötungsrate erheblich und scheint bei 50 C sogar auf null zurückzugehen. Immerhin erhält man auch hier steigende Abtötung mit der Behandlungstemperatur, ein Ergebnis, das mit den Untersuchungen von NOVITSKY et al. (1974) an *B.subtilis*, TISCHER & HURWICZ (1954, nach PRECHT et al. 1955) und RYAN & KIRITANI (1959, nach FARRELL & ROSE 1967a) an *E.coli* in Übereinstimmung ist. Die im Vergleich zu *T.aquaticus* oder *B.subtilis* (NOVITSKY et al. 1974) vergrößerte Hitzestabilität der *B.stearothermophilus*-Zellen hängt vielleicht in irgendeiner Weise mit dem Charakter des Sporenbildners zusammen.

Eine mögliche weitere Erklärung für die geringere Abtötungsrate bei längerer Behandlungszeit ist die Exkretion von Substanzen in das Puffermilieu, die eine Schutzfunktion haben

könnten, ein Effekt, der sich auch bei größerer Zelldichte bemerkbar machen kann (FARRELL & ROSE 1967a).

Eine Schutzfunktion von Kohlenhydraten (Glucosezugabe) konnte bei beiden untersuchten Organismen nicht signifikant ausgemacht werden.

Der Einfluß der Wachstumstemperatur auf die Hitzeresistenz wurde nur bei *B.stearothermophilus* untersucht (Abb. 41). Die 65 C-Behandlung vertrugen die bei 50 C gewachsenen Zellen am schlechtesten, die bei 70 C gewachsenen Zellen am besten. Die Ergebnisse decken sich mit denjenigen von WILLIAMS & ROBERTSON (1954) und COOK & GILBERT (1968, beide zitiert nach FRIESEN & ANDERSON 1974), die ebenfalls eine Zunahme der Hitzeresistenz mit steigender Züchtungstemperatur an verschiedenen *B.stearothermophilus*-Stämmen beobachteten. Auch FRIESEN & ANDERSON (1974) erhielten steigende Resistenz von *B.stearothermophilus*-Sporen mit der Temperatur mit Ausnahme der bei 70 C gewachsenen Zellen. Es muß aber erwähnt werden, daß es auch entgegengesetzte Befunde gibt (Abnahme der Resistenz mit zunehmender Wachstumstemperatur, Hinweise bei CHRISTOPHERSEN 1973).

Die registrierte Veränderung der Hitzeresistenz mit der Wachstumstemperatur könnte in Übereinstimmung mit der Lipidtheorie interpretiert werden: der Schmelzpunkt der Lipidverbände steigt ja mit der Wachstumstemperatur an (vermehrter Anteil gesättigter Fettsäuren), wodurch die Lipide auch bei höheren Temperaturen ihre Funktion noch wahrzunehmen vermögen.

Nun müßte bei Gültigkeit der Membran- bzw. der Lipidtheorie bei der Organismenabtötung eine Zunahme organischen Materials im Milieu mit steigender Behandlungstemperatur zu beobachten sein. Diesen Effekt haben JANOTA-BASSALIK & DZIECHCIARZ (1971) an *B.megaterium* bestimmt: von 3 C bis 70 C Be-

handlungstemperatur wurde eine Absorptionszunahme bei 260 nm registriert, was auf das Freisetzen RNA-haltigen Materials aus den Zellen zurückgeführt wird.

MILLER & ORDAL (1972) berichten von dem Verlust 260 nm absorbierenden Materials beim Erhitzen von *B.subtilis*, was von ihnen als Membranzerstörung gewertet wird.

Auch für *T.aquaticus* und *B.stearothermophilus* läßt sich ähnliches aussagen (s. Abb. 42). Von 50 bis 60 C erhält man für *T.aquaticus* einen starken Extinktionsanstieg, von da an bis 75 C eine verlangsamte Zunahme. In der gleichen Abbildung ist auch der Effekt von zugegebenen Ionen zu sehen: Die Extinktionszunahme gegenüber der hitzeunbehandelten Kontrollprobe ist - bis auf 50 C - deutlich reduziert.

Das ist vereinbar mit der z.B. von LJUNGER (1970) und FRIESEN & ANDERSON (1974) vertretenen Auffassung, daß Ionen - vor allem Ca-Ionen - einen deutlichen Einfluß auf die Hitzeresistenz von Mikroorganismen - und auch von Biomakromolekülen und einzelnen Zellstrukturen - besitzen. Inzwischen weiß man, daß ganz allgemein bivalente Kationen Membranen stabilisieren können.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde an zwei thermophilen Bakterienstämmen (*Bacillus stearothermophilus* und *Thermus aquaticus*) untersucht, welchen Einfluß Veränderungen der Milieuparameter (pH, Temperatur, Nährstoffzusammensetzung und -konzentration, O₂-Angebot) auf das Wachstumsverhalten und die Energie- und Kohlenstoffverwertung dieser Mikroorganismen ausüben. Darüber hinaus wurden Experimente zum Studium der Hitzeresistenz der Organismen in einem Puffermilieu durchgeführt.

1.) Anhand kalorimetrischer Messungen unter Stickstoffatmosphäre sowie kolorimetrischer Messungen bei unterschiedlichem O₂-Angebot konnte ermittelt bzw. nachgewiesen werden, daß *B.stearothermophilus* ein fakultativ aerober und *T.aquaticus* ein obligat aerober Mikroorganismus ist (s. z.B. Abb. 18, Abb. 21-23 A, Abb. 31).

2.) Bei der Bestimmung der Aktivierungsgrößen des *T.aquaticus*-Wachstums zeigte sich, daß die Ergebnisse in Einklang zu bringen sind mit den Werten für andere Mikroorganismen aus verschiedenen Temperaturgruppen und sogar mit den Angaben für völlig andere biologische Vorgänge (Kap. 3.2.1, 4.1, Tab. 5, Tab. 13).

3.) Es ergab sich eine Temperaturabhängigkeit der Bakterien-dichte Verteilung pro Extinktionseinheit für beide Organismen, die mit - auch anderswo beobachteten - strukturellen und morphologischen Modifikationen der Mikrobenzellen in Verbindung gebracht wird (Kap. 3.3, 4.2). Die Verbrennungswärmen beider Organismen waren dagegen über den gesamten jeweils untersuchten Temperaturbereich konstant (Kap. 3.4).

4.) Aufgrund entsprechender Hinweise in den photometrischen und kalorimetrischen Messungen wird vermutet, daß der unter-

suchte *B.stearothermophilus*-Stamm beim Wachstum im sauren und alkalischen Milieu unterschiedliche Stoffwechselleistungen erbringen kann. Sowohl die Stoffwechselaktivität (repräsentiert durch den momentanen Wärmefluß) als auch die pH-Verschiebung zeigen eindeutige Differenzen (Kap. 3.5.1.1, 3.6.1, Abb. 38).

5.) Bei stickstofflimitiertem Wachstum von *B.stearothermophilus* wurden gegenüber optimalen Nährstoffbedingungen drastische Ertragsreduktionen festgestellt, die mit Entkopplungsprozessen ("chemische Entkopplung") zwischen Katabolismus und Anabolismus erklärt werden (Kap. 3.5.1.2, 3.6.1, 4.3.2, Abb. 16).

6.) Der materielle Wirkungsgrad war bei *B.stearothermophilus* für jede Temperatur abhängig vom O_2 -Angebot pro ml Medium mit der Tendenz: steigender O_2 -Vorrat begünstigt effektivere Substratausnutzung. Das ist beim fakultativ aeroben Charakter des Organismus auch nicht anders zu erwarten (Kap. 3.5.1.3, 4.3.2, Abb. 21-23). Der beste aerobe Wirkungsgrad bei jeder Temperatur liegt dabei im Vergleich zu den Erträgen mesophiler aerober Mikroorganismen auch nach Korrektur noch stets niedriger (s. 4.3.2). Gleiches gilt für den Ertrag des *T.aquaticus*-Wachstums. Die anaeroben *B.stearothermophilus*-Ausbeuten zeigen dagegen keine wesentlichen Differenzen zu den Werten anaerober mesophiler Organismen. Ein Bezug des gebildeten Trockengewichts von *B.stearothermophilus* auf einen hypothetisch angesetzten O_2 -Verbrauch ergab eine größenordnungsmäßige Übereinstimmung mit den bekannten Daten mesophiler Mikroorganismen, allerdings waren die Werte um den Faktor 2 - 3 geringer, was die Annahme einer intensiven O_2 -Aufnahme der thermophilen Organismen mit relativ schlechtem Wirkungsgrad nahelegt.

7.) Der Einfluß der Glucosekonzentration auf den Ertrag in verschlossenen RGSV wurde in den Kapiteln 3.5.1.4 und 4.3.1

beschrieben: bis zu einer Konzentration von 0.2 % nehmen Trockengewichtsproduktion und Glucoseverbrauch pro Volumeneinheit bzw. die Gesamt-TG-Produktion und der Gesamtglucoseverbrauch linear zu, was einen konstanten Ertrag bis 0.2 % liefert, und was außerdem bedeutet, daß ein Sauerstoffangebot von ~ 1 mg/ml bis zu Glucosekonzentrationen von 0.2 % für *B.stearothermophilus* ausreichend ist und keine Wachstums-(Ausbeuten-)Beeinflussung hervorruft. Oberhalb 0.2 % Glucose wurde, relativ zur Trockengewichtsproduktion bei niedrigen Konzentrationen gesehen, ein zu großer Glucoseverbrauch und damit verringerte Ausbeute beobachtet. Dies wurde auf einen Umschaltungsverfahren von oxidativen (aeroben) auf nichtoxidative (anaerobe) Reaktionen wegen O_2 -Limitierung zurückgeführt (4.3.2, 4.4).

Für *T.aquaticus* wurde ein steigender Gesamtertrag bis zu einer Konzentration von 0.1 % erhalten. Bei Konzentrationen oberhalb von 0.2 % Glucose wurde das Wachstum deutlich inhibiert (3.5.2, Abb. 33).

8.) Für *B.stearothermophilus* wurde unter aeroben wie anaeroben Bedingungen eine Abhängigkeit des materiellen Ertrages von der Temperatur im Bereich 50 - 70 C registriert: der Ertrag sank mit steigender Temperatur (Abb. 24). Die Resultate wurden interpretiert als zunehmende "physikalische" Entkopplung oder aber als Bestätigung der dynamischen Theorie (4.3.3).

T.aquaticus zeigte keine derartige Temperaturabhängigkeit im Bereich 60 - 75 C.

9.) Die Thermogramme des *B.stearothermophilus*-Wachstums enthüllten mehrphasiges Wachstum des Organismus (s. Abb. 35) mit deutlich verschiedenen Wirkungsgraden in den verschiedenen Phasen.

10.) Die Speicherung der beim Substratabbau freigesetzten Energie wird von beiden Organismen nur unvollkommen ausge-

führt. Man findet für beide Stämme eine temperaturabhängige Energiespeicherung zwischen 23 und 29 % (aerobe Verhältnisse, s. Tab. 7, 10, 15, 16) bzw. zwischen 12 und 20 % (anaerobe Verhältnisse, *B.stearothermophilus*, Tab. 7, 10, 15), wenn auf die beim aeroben Substratabbau verfügbare Energie bezogen wird. Entsprechend große Anteile Substratkohlenstoff pro Substrateinheit tauchen auch jeweils als Zellmaterial auf (bei *B.stearothermophilus*). Der unbekannte anaerobe Glucoseabbauweg von *B.stearothermophilus* setzt außerordentlich viel Energie frei (4.4).

11.) Die Wärmeproduktion pro g verbrauchter Glucose bleibt für *B.stearothermophilus* konstant über den gesamten untersuchten Temperaturbereich (~ 10.2 kJ/g im aeroben, ~ 6.2 kJ/g im anaeroben Fall (Tab. 10)), was als temperaturunabhängige, nicht von den anabolischen Prozessen kontrollierte katabolische Aktivität gedeutet wird. Die Werte liegen weit oberhalb der für mesophile Organismen bestimmten Wärmeabgaben beim Wachstum (Tab. 17). Zusammen mit dem mit der Temperatur fallenden materiellen Wirkungsgrad ergibt sich eine steigende Wärmeproduktion pro g Trockengewicht mit der Temperatur, vermutlich eine Folge von Entkopplungsprozessen oder von gestörten, erschwerten Wachstumsabläufen (4.4).

12.) Die Abtötungskinetiken von *T.aquaticus* repräsentieren für jede Behandlungstemperatur einen Verlauf, der einer Kinetik erster Ordnung entspricht, was nach Membran- und Lipidtheorie zu erwarten ist. Darüber hinaus wird die Abtötungsrate mit zunehmender Temperatur größer (Abb. 39.) Offensichtlich kann *T.aquaticus* für längere Zeit bei erhöhten Temperaturen ohne Nährstoffzufuhr nicht überleben.

Für *B.stearothermophilus* fällt es schwer, eine entsprechende einfache physikalische AbsterbeGesetzmäßigkeit zu finden: nach einer anfänglich starken Reduktion der Überlebendenzahl werden pro Zeiteinheit nur noch relativ wenige Zellen abge-

tötet. Es scheint fast so, als ob ein nur leicht temperaturabhängiges konstantes Überlebendenniveau existieren würde. Es ist unbekannt, ob diese gegenüber *T.aquaticus* vergrößerte Hitzeresistenz etwas mit dem Sporenbildnercharakter von *B.stearothermophilus* zu tun hat, oder ob andere Schutzmechanismen in der Zellpopulation nach bestimmter Zeit wirksam werden.

Wenn die *B.stearothermophilus*-Zellen bei unterschiedlichen Züchtungstemperaturen gezogen sind und derselben Behandlungstemperatur ausgesetzt werden, erhält man als resistensteste Zellen diejenigen der höchsten Wachstumstemperatur, als hitzesensibelste Zellen diejenigen der niedrigsten Wachstumstemperatur (Abb. 41), was mit der Lipid- bzw. Membrantheorie erklärt werden kann.

13.) Es wurde beobachtet, daß sowohl *T.aquaticus* als auch *B.stearothermophilus* im Puffermilieu bei Hitzebehandlung mit steigender Temperatur zunehmende Mengen 260 nm absorbierenden Materials freisetzen, ein Ergebnis, das der Vorstellung von der zunehmenden Belastung oder Zerstörung der Zellmembran mit der Temperatur entspricht (Membranlöcher). Eine Schutzfunktion gegen die Zerstörung scheinen anorganische Ionen auszuüben (Abb. 42, Kap. 4.5).

6. SCHLUSSBEMERKUNG

Es wäre verfrüht, die vorliegenden Ergebnisse für andere thermophile Mikroorganismen verallgemeinern zu wollen, zumal bei den beiden untersuchten Bakterienarten teilweise schon deutliche Differenzen zutage getreten sind. Noch viele Untersuchungen zum Kohlenstoff- und Energiestoffwechsel und zur Hitzeresistenz und -adaptation sind nötig, um tiefere allgemeine Einblicke in die physiologischen Aspekte des Thermophilienphänomens gewinnen zu können. Dabei wäre es notwendig, den materiellen und energetischen Bilanzierungen biochemische Analysen zur Seite zu stellen. Dennoch sind schon die hier verwendeten physikalischen (Photometrie, Kalorimetrie) und biologischen Methoden (Plattenversuche) in der Lage, eine Fülle von Fragen über thermophile - und andere - Organismen zufriedenstellend zu beantworten.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Allen, M.B. (1950) The dynamic nature of thermophily
J.Gen.Physiol, 33, 205-214
- Allen, M.B. (1953) The thermophilic aerobic sporeforming
bacteria; Bacteriol. Rev. 17, 125-173
- Andreesen, J.R.,
A. Schaupp, C. Neurauter,
A. Brown, L.G. Ljungdahl
(1973) Fermentation of glucose, fructose and
xylose by Clostridium thermoaceticum:
effect of metals on growth yield,
enzymes and the synthesis of acetate
from CO₂; J. Bacteriol. 114, 743-751
- Babel, W., H.A. Rosenthal,
S. Rapoport (1972) A unified hypothesis on the causes of
the cardinal temperatures of microorga-
nisms; the temperature minimum of
Bacillus stearothermophilus
Acta Biol.Med.Germ. 28, 565-576
- Barnes, L.D.,
E. Stellwagen (1973) Enolase from the thermophilic Thermus
X-1; Biochemistry 12, 1559-1565
- Baschnagel-de Pamphilis,
J., R.S. Hanson Relationship between glucose utilization
and growth rate in Bacillus subtilis
J. Bacteriol. 98, 222-225
- Bauchop, T.,
S.R. Elsdon (1960) The growth of microorganisms in
relation to their energy supply
J.Gen.Microbiol. 23, 457-469
- Belaich, J.P.,
J.C. Senez (1967) Application de la méthode micro-
calorimétrique à l'étude de l'énergétique
de la croissance bactérienne
in: Les développements récents de la
microcalorimétrie et de la thermogénèse
C.N.R.S., Paris, pp. 381-394
- Belaich, J.P.,
J.C. Senez,
M. Murgier (1968) Microcalorimetric study of glucose
permeation in microbial cells
J. Bacteriol. 95, 1750-1757
- Belaich, J.P.,
M. Murgier, A. Belaich,
P. Simonpietri (1971) Application de la microcalorimétrie à
la mesure de l'affinité de cellules
microbiennes pour leur substrat
énergétique
Proc.First Eur.Biophys.Congr. IV, 289-297
Vlg. Wiener Medizin. Akad., Wien
- Belehradek, J. (1931) Le mécanisme physico-chimique de
l'adaptation thermique
Protoplasma 12, 406-434

- Belehradek, J. (1935) Temperature and living matter
Bornträger, Berlin
- Bodman, H.,
N. Welker (1969) Isolation of spheroplasts of *Bacillus*
stearothermophilus
J. Bacteriol. 97, 924-935
- Boivinet, P. (1964) Perfectionnements aux méthodes
d'étalonnage et d'emploi du micro-
calorimètre E. Calvet, utilisation
en microbiologie
Thesis, Faculté des Sciences,
Univ. d'Aix-Marseille
- Boivinet, P. (1971) Contributions de la calorimétrie aux
recherches biologiques actuelles
Proc. First Eur. Biophys. Congr. IV, 277-284
Vlg. Wiener Medizin. Akad., Wien
- Bott, T.L.,
T.D. Brock (1969) Bacterial growth rates above 90 C in
Yellowstone hot springs
Science 164, 1411-1412
- Brandts, J.F. (1967) Heat effects on proteins and enzymes
in: Thermobiology, ed. A.H. Rose,
pp. 25-72 Acad. Press, New York
- Brock, T.D. (1967a) Life at high temperatures
Science 158, 1012-1019
- Brock, T.D. (1967b) Microorganisms adapted to high
temperatures; Nature 214, 882-885
- Brock, T.D. (1969) Microbial growth under extreme conditions
Symp. Soc. Gen. Microbiol. XIX, 15-41
- Brock, T.D. (1970) High temperature systems
Ann. Rev. Ecol. System. 1, 191-220
- Brock, T.D.,
M.L. Brock (1968) Relationship between environmental
temperature and optimum temperature of
bacteria along a hot spring thermal
gradient
J. Appl. Bacteriol. 31, 54-58
- Brock, T.D.,
H. Freeze (1969) *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n.,
a nonsporulating extreme thermophile
J. Bacteriol. 98, 289-297
- Brock, T.D.,
G.K. Darland (1970) Limits of microbial existence: temperature
and pH; Science 169, 1316-1318

- Brock, T.D.,
M.L. Brock (1971) Temperature optimum of non-sulphur bacteria from a spring at 90 C
Nature 233, 494-495
- Brock, T.D., M.L. Brock,
T.L. Bott, M.R. Edwards
(1971) Microbial life at 90C: the sulphur bacteria of Boulder spring
J. Bacteriol. 107, 303-314
- Brock, T.D., K.M. Brock,
R.T. Belly, R.L. Weiss
(1972) *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature
Arch. Mikrobiol. 84, 54-68
- Brues, C.T. (1932) Further studies on the fauna of North American hot springs
Proc. Am. Acad. Arts Sci. 67, 185-303
- Bubela, B., E.S. Holdsworth (1966a) Amino acid uptake, protein and nucleic acid synthesis and turnover in *Bacillus stearothermophilus*
B.B.A. 123, 364-375
- Bubela, B.,
E.S. Holdsworth (1966b) Protein synthesis in *Bacillus stearothermophilus*
B.B.A. 123, 376-389
- Burton, A.C. (1936) The basis of the principle of the master reaction in biology
J. Cellul. Comp. Physiol. 9, 1-14
- Calvet, E. (1962) Recent progress in microcalorimetry in: *Experimental thermochemistry*, Vol. II, pp. 385-411, New York
- Calvet, E., H. Prat
(1956) Microcalorimétrie - applications physicochimiques et biologiques
Masson, Paris
- Chan, M., R.H. Himes,
J.M. Akagi (1971) Fatty acid composition of thermophilic, mesophilic and psychrophilic clostridia
J. Bacteriol. 106, 876-881
- Chan, M., Y.P. Virmani,
R.H. Himes, M. Akagi
(1973) Spin-labeling studies on the membrane of a facultative thermophilic *Bacillus*
J. Bacteriol. 113, 322-328
- Chapman, D. (1967) The effect of heat on membranes and membrane constituents
in: *Thermobiology*, ed. A.H. Rose, pp. 123-146, Acad. Press, London
- Chapman, D. (1969) Physical studies of lipid-lipid and lipid-protein interactions
Lipid 4, 251-260

- Chapman, D. (1970) The chemical and physical characteristics of biological membranes in: *Membranes and ion transport*, Vol. 1, ed. E.E. Bittar, Wiley-Interscience, London
- Christophersen, J. (1973) Basic aspects of temperature action on microorganisms in: *Temperature and life*, ed. H. Precht, J. Christophersen, H. Hensel, W.Larcher, pp. 3-59, Springer Verlag, Berlin
- Cole, R.M., T.J. Popkin, R.J. Boylan, H.H. Mendelson (1970) Ultrastructure of a temperature-sensitive rod mutant of *Bacillus subtilis* *J. Bacteriol.* 103, 793-810
- Cook, A.M., R.M. Gilbert (1968) *J. Food Technol.* 3, 295
- Coultate, T.P., T.K. Sundaram (1975) Energetics of *Bacillus stearothermophilus* growth: molar growth yield and temperature effects on growth efficiency *J. Bacteriol.* 121, 55-64
- Crisan, E.V. (1973) Current concepts of thermophilism and the thermophilic fungi *Mycologia* 65, 1171-1198
- Crozier, W.J. (1925) On biological oxydations as function of temperature *J.Gen.Physiol.* 7, 189-216
- Delente, J.J., J.H. Johnson, M.J. Kuo, R.J. O'Connor, L.E. Weeks (1974) Production of a new thermostable neutral α -galactosidase from a strain of *Bacillus stearothermophilus* *Biotechn.Bioeng.* 16, 1227-1243
- Doig, A.R.Jr. (1973/74) Stability of enzymes from thermophilic microorganisms Contribution No. 2267, Dept.Nutr.Food Sci., Inst.Technol., Cambridge, Massachusetts
- Dowben, R.M. (1969) Composition and structure of membranes in: *Biological membranes*, ed. R.M.Dowben, pp. 1-38, Little, Brown & Co., Boston
- Epstein, I., N. Grossowicz (1969a) Prototrophic thermophilic *Bacillus*: isolation, properties and kinetics of growth *J. Bacteriol.* 99, 414-417
- Epstein, I., N. Grossowicz (1969b) Intracellular protein breakdown in a thermophile *J. Bacteriol.* 99, 418-421
- Eriksson, R.F.Holme (1973) The use of microcalorimetry as an analytical tool for microbial processes *Biotechn.Bioeng.Symp.No.* 4, 581-590

- Farrell, J.,
A.H. Rose (1967a) Temperature effects on microorganisms
in: Thermobiology, ed. A.H. Rose
Acad. Press, London
- Farrell, J.,
A.H. Rose (1967b) Temperature effects on microorganisms
Ann.Rev.Microbiol. 21, 101-116
- Forrest, W.W.
(1967) Energies of activation and uncoupled
growth in *Streptococcus faecalis* and
Zymomonas mobilis
J. Bacteriol. 94, 1459-1463
- Forrest, W.W.
(1972) Microcalorimetry
in: Methods of microbiology 6 B, eds.
J.R. Norris & D.W. Ribbons
Acad. Press, London
- Friedman, S.M.
(1968) Protein-synthesizing machinery of
thermophilic bacteria
Bacteriol. Rev. 32, 27-38
- Friedman, S.M.
(1971) Heat stabilities of ribosomal subunits
and reassociated ribosomes from *Bacillus*
stearothermophilus
J. Bacteriol. 108, 589-591
- Friesen, W.T.,
R.A. Anderson (1974) Effects of sporulation conditions and
cation-exchange treatment on the thermal
resistance of *Bacillus stearothermophilus*
spores
Can.J.Pharm.Sci. 9, 50-53
- Gaughran, E.R.L.
(1947a) The thermophilic microorganisms
Bacteriol.Rev. 11, 189-225
- Gaughran, E.R.L.
(1947b) The saturation of bacterial lipids as
a function of temperature
J. Bacteriol. 53, 506
- Golovacheva, R.S.
(1967) Spontaneous generation of spherical forms
in obligate thermophilic bacilli
Microbiologiya (USSR) 36, 560
- Grainger, J.N.R.
(1973) The measurement of the efficiency of
growth at different temperature and its
significance
in: Effects of temperature on ectothermic
organisms, ed. W. Wieser, Springer Verlag,
Berlin
- Griffiths, M.W.
T.K.Sundaram (1973) Isocitrate lyase from a thermophilic
bacillus: effects of salts on enzyme
activity
J. Bacteriol. 116, 1160-1169

- Gunsalus, I.C.,
G.W. Shuster (1961) Energy yielding metabolism in bacteria
in: The bacteria II, eds. I.C. Gunsalus & G.W. Shuster, pp. 1-58
Acad.Press, New York
- Haberstich, H.U.,
H. Zuber (1974) Thermoadaptation of enzymes in thermophilic and mesophilic cultures of *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus caldotenax*
Arch.Mikrobiol. 98, 275-287
- Hachimori, A.,
N. Muramatsu, Y. Nosoh (1970) Studies on an ATPase of thermophilic bacteria I. Purification and properties;
B.B.A. 206, 426-437
- Hachimori, A., A.Matsunaga,
M. Shimizu, T. Samejima,
Y. Nosoh (1974) Purification and properties of glutamine synthetase from *Bacillus stearothermophilus* B.B.A. 350, 461-474
- Hadjipetrou, L.P.,
J.P. Gerritts,
F.A.G. Teulings,
A.H. Stouthamer (1964) Relation between energy production and growth of *Aerobacter aerogenes*
J.Gen.Microbiol. 36, 139-150
- Harrison, D.E.F.,
J.E. Loveless (1971) The effect of growth conditions on respiratory activity and growth efficiency in facultative anaerobes grown in the chemostat culture
J.Gen.Microbiol. 68, 35-43
- Heilbrunn, L.V.
(1924) The colloid chemistry of protoplasm IV. The heat coagulation of protoplasm
Amer. J.Physiol. 69, 190-199
- Heinen, W. (1971) Growth conditions and temperature-dependent substrate specificity of two extremely thermophilic bacteria
Arch.Mikrobiol. 76, 2-17
- Heinen, W.,
H.P. Klein,
C.M. Volkmann (1970) Fatty acid composition of *Thermus aquaticus* at different growth temperatures
Arch.Mikrobiol. 72, 199-202
- Heinen, U.J., G. Klein,
H.P. Klein, W. Heinen
(1971) Comparative studies on the nature and distribution of pigments from two thermophilic bacteria
Arch.Mikrobiol. 76, 18-27
- Hengartner, H.,
H. Zuber (1973) Isolation and characterization of a thermophilic glucokinase from *Bacillus stearothermophilus*
FEBS Letters 37, 212-216

- Herbert, D. (1958) Recent progress in microbiology, 381-396
Int.Congr. Microbiol., 7 th
- Herbert, D., R.Elsworth, J.Gen.Microbiol. 14, 601
R.C. Telling (1956)
- Hernandez, E., Anaerobic growth yields of Aerobacter
M.J. Johnson (1967a) cloacae and Escherichia coli
J. Bacteriol. 94, 991-995
- Hernandez, E., Energy supply and cell yield in
M.J. Johnson (1967b) aerobically grown microorganisms
J. Bacteriol. 94, 996-1001
- Hibino, Y., Y. Nosoh, On the conformation of NADP-dependent
T. Samejima (1974) isocitrate dehydrogenase from Bacillus
stearothermophilus
J. Biochem. 75, 553-561
- Ingraham, J.L. (1958) Growth of psychrophilic bacteria
J. Bacteriol. 76, 75-80
- Ingraham, J.L. (1962) Temperature relationships
in: The Bacteria IV, eds. I.C. Gunsalus
& R.Y. Stanier, pp. 265-296
Acad. Press, New York
- Jackson, T.J., R.F. Thermomicrobium , a new genus of
Ramaley, W.G.Meinschein extremely thermophilic bacteria
(1973) Int.J.Syst.Bacteriol. 23, 28-36
- Janota-Bassalik, L., The comparison of morphological and
K. Dziechciarz (1970) physiological characteristics of
mesophilic and thermophilic varieties
of Bacillus megaterium, Acta Microbiol.
Polon.Ser.B, 2, 199-205
- Janota-Bassalik,L., The functioning of the membranes of the
K. Dziechciarz (1971) cells of mesophilic and thermophilic
varieties of Bacillus megaterium
Acta Microbiol.Polon.Ser.B. 3, 43-48
- Jung, L., R. Jost, Metabolic differences in Bacillus
E. Stoll, H. Zuber stearothermophilus grown at 55 C and
(1974) 37 C
Arch.Mikrobiol. 95, 125-138
- Koffler, H. (1957) Protoplasmic differences between
mesophiles and thermophiles
Bacteriol.Rev. 21, 704-706
- Lamprecht, I. Mikrokolorimetrische Untersuchungen an
(1969) Hefekulturen und Beiträge zur theoretischen
Deutung
Dissertation, FU Berlin

- Lamprecht, I.,
B. Schaarschmidt (1974) Beiträge der Mikrokolorimetrie zu Stoffwechseluntersuchungen an Mikroorganismen und Geweben in: Pressedienst Wissenschaft 4, FU Berlin
- Lamprecht, I., G. Welge,
H. Reiling, U. Wendker (1974) Recherches microcalorimétriques du métabolisme chez des bactéries thermophiles Rev.Gén.Therm.Fr. 150/151, 521-524
- Levine, D.W.,
C.L. Cooney (1973) Isolation and characterization of a thermotolerant methanol-utilizing yeast Appl.Microbiol. 26, 982-990
- Ljungdahl, L.G.,
J.M. Brewer, S.H. Neece,
T. Fairwell (1970) Purification, stability and composition of formyltetrahydrofolate synthetase from Clostridium thermoaceticum J.Biol.Chem. 245, 4791-4797
- Ljunger, C. (1970) On the nature of the heat resistance of thermophilic bacteria Physiol.Plant. 23, 351-364
- Ljunger, C. (1973) Further investigations on the nature of the heat resistance of thermophilic bacteria Physiol.Plant. 28, 415-418
- Loll, U. (1974) Stabilisierung hochkonzentrierter organischer Abwässer und Abwasserschlämme durch aerob-thermophile Abbauprozesse Dissertation, TH Darmstadt
- McFeters, G.A.,
J.T. Ulrich (1972) Effect of temperature on the respiration and cytochromes of an extreme thermophile J.Bacteriol. 110, 777-779
- Manning, G.B.,
L.L. Campbell (1961) Thermostable α -amylase of Bacillus stearothermophilus I. Crystallization and some general properties J.Biol.Chem. 236, 2952-2957
- Manning, G.B.,
L.L. Campbell,
R.J. Foster (1961) Thermostable α -amylase of Bacillus stearothermophilus II. Physical properties and molecular weight J.Biol.Chem. 236, 2958-2961
- Matsché, N.F.,
J.F. Andrews (1973) A mathematical model for the continuous cultivation of thermophilic microorganisms Biotechnol.Bioeng.Symp. No. 4, 77-90

- Matsunaga, A., Y.Nosoh
(1974) Conformational change with temperature and thermostability of glutamine synthetase from *Bacillus stearothermophilus* B.B.A. 365, 208-211
- Meeks, J.C.,
R.W. Castenholz (1971) Growth and photosynthesis in an extreme thermophile, *Synechococcus lividus* (Cyanophyta) Arch.Mikrobiol. 78, 25-41
- Miller, H.M.,
M.G. Shepherd,
P.A. Sullivan (1973) Protein turnover in thermophilic and mesophilic fungi Proc.Univ.Otago MedSch. 51, 56-58
- Miller, H.M., P.A.Sullivan,
M.G. Shepherd (1974) Intracellular protein breakdown in thermophilic and mesophilic fungi Biochem.J. 144, 209-214
- Miller, L.L.,
Z.J. Ordal (1972) Thermal injury and recovery of *Bacillus subtilis* Appl.Microbiol. 24, 878-884
- Miquel, P. (1888) Monographie d'un bacille vivant au-dela de 70 centigrades Ann.de Micrograph. 1
- Mitchell, R. (1974) The evolution of thermophily in hot springs Quart.Rev.Biol. 49, 229-241
- Monod, J. (1942) Recherches sur la croissance des cultures bactériennes Hermann, Paris
- Monod, J. (1971) Zufall und Notwendigkeit Piper, München
- Morowitz, H.J.
(1970) B.B.A. 40, 340
- Neale, E.K.,
G.B. Chapman (1970) Effect of low temperature on the growth and fine structure of *Bacillus subtilis* J. Bacteriol. 104, 518-528
- Ng, H., J.L.Ingraham,
A.G. Marr (1962) Damage and derepression in *Escherichia coli* resulting from growth at low temperatures J. Bacteriol. 84, 331-339
- Ng, H. (1969) Effect of decreasing growth temperature on cell yield of *Escherichia coli* J. Bacteriol. 98, 232-237

- Novitsky, T.J., M. Chan,
R.H. Himes, J.M. Akagi
(1974) Effect of temperature on the growth
and cell wall chemistry of a
facultative thermophilic bacillus
J. Bacteriol. 117, 858-865
- Ohta, Y., Y. Ogura,
A. Wada (1966) J. Biol. Chem. 241, 5919
- Oshima, T., K. Imahori
(1974) Description of *Thermus thermophilus*
(Yoshida and Oshima) comb. nov., a
nonsporulating thermophilic bacterium
from a Japanese thermal spa
Int.J.System.Bacteriol. 24, 102-112
- Oshima, M.,
T.Yamakawa (1974) Chemical structure of a novel
glycolipid from an extreme thermophile,
Flavobacterium thermophilum
Biochemistry 13, 1140-1146
- Pace, B., L.L. Campbell
(1967) Correlation of maximal growth temperature
and ribosome heat stability
Proc.Nat.Acad.Sci. 57, 1110-1116
- Parfait, R. (1973) Arginyl-tRNA synthetase from *Bacillus*
stearothermophilus: heat inactivation
and substrate induced protection
FEBS Letters 29, 323-325
- Payne, W.J. (1970) Energy yields and growth of heterotrophs
Ann.Rev.Microbiol. 24, 17-52
- Phillipson, J. (1964) *Oikos* 15, 130
- Pfueller, S.L.,
W.H. Elliott (1969) J. Biol.Chem. 244, 48
- Pozmogova, I.N.,
Y.M. Miller,
L.G. Loginova (1974) Oxygen consumption by thermophilic and
mesophilic bacteria
Mikrobiologiya 43, 30-33
- Precht, H.,
J. Christophersen,
H.Hensel (1955) Temperatur und Leben
Springer, Berlin
- Ray, P.H., D.C. White,
T.D. Brock (1971a) Effect of temperature on the fatty
acid composition of *Thermus aquaticus*
J. Bacteriol. 106, 25-30
- Ray, P.H., D.C. White,
T.D. Brock (1971b) Effect of growth temperature on the
lipid composition of *Thermus aquaticus*
J. Bacteriol. 108, 227-235
- Rosenberger, R.F.,
S.R. Elsdén (1960) The yields of *Streptococcus faecalis*
grown in continuous culture
J.Gen.Microbiol. 22, 726-739

- | | |
|--|--|
| Roth, W.A., F. Becker
(1956) | Kalorimetrische Methoden zur Bestimmung
chemischer Reaktionswärmen
Vieweg, Braunschweig |
| Ryan, F.J., K. Kiritani
(1959) | J.Gen.Microbiol. <u>20</u> , 644 |
| Saiki, T., H. Shinshi,
K. Arima (1973) | Studies on homoserine dehydrogenase from
an extreme thermophile, <i>Thermus flavus</i>
AT-62; J. Biochem. <u>74</u> , 1239-1248 |
| Schaarschmidt, B. (1972) | Mikrokalorimetrische Untersuchungen zum
Betriebsstoffwechsel UV-strahlensensibler
Hefemutanten
Dissertation, FU Berlin |
| Schaupp, A.,
L.G. Ljungdahl
(1974) | Purification and properties of acetate
kinase from <i>Clostridium thermoaceticum</i>
Arch.Microbiol. <u>100</u> , 121-129 |
| Schlegel, H.G. (1972) | Allgemeine Mikrobiologie
Thieme, Stuttgart |
| Schulman, M.,
R.K. Ghambeer,
L.G. Ljungdahl, H.G. Wood
(1973) | Total synthesis of acetate from CO ₂
VII. Evidence with <i>Clostridium</i>
<i>thermoaceticum</i> that the carboxyl of
acetate is derived from the carboxyl
of pyruvate by transcarboxylation and
not by fixation of CO ₂
J.Biol.Chem. <u>248</u> , 6255-6261 |
| Senez, J. (1962) | Some considerations on the energetics
of bacterial growth
Bacteriol.Rev. <u>26</u> , 95-107 |
| Shaw, M.K. (1967) | Effect of abrupt temperature shift on
the growth of mesophilic and psychro-
philic yeast
J.Bacteriol. <u>93</u> , 1332-1336 |
| Shen, P.Y., E. Coles,
J.L. Foote, J. Stenesh
(1970) | Fatty acid distribution in mesophilic
and thermophilic strains of the genus
<i>Bacillus</i>
J. Bacteriol. <u>103</u> , 479-481 |
| Shoaf, W.T., S.H. Neece,
L.G. Ljungdahl (1974) | Effects of temperature and ammonium
ions on formyltetrahydrofolate synthetase
from <i>Clostridium thermoaceticum</i>
B.B.A. <u>334</u> , 448-458 |
| Siegel, B.V.,
C.E. Clifton (1950) | J. Bacteriol. <u>60</u> , 113 |

- Singleton, R.Jr.,
R.E. Amelunxen (1973) Proteins from thermophilic microorganisms
Bacteriol.Rev. 37, 320-342
- Smith, P.F.,
T. Langworthy,
W. Mayberry, A. Houglund (1973) Characterization of the membranes of Thermoplasma acidophilum
J. Bacteriol. 116, 1019-1028
- Snedecor, B., C.L.Cooney (1974) Thermophilic mixed culture of bacteria utilizing methanol for growth
Appl. Microbiol. 27, 1112-1117
- Souza, K.A., L.L.Kostiwi,
B.J. Tyson (1974) Alterations in normal fatty acid composition in a temperature-sensitive mutant of a thermophilic Bacillus
Arch.Microbiol. 97, 89-102
- Stellwagen, E.,
M.M. Cronlund,
L.D. Barnes (1973) A thermostable enolase from the extreme thermophile Thermus aquaticus YT-1
Biochemistry 12, 1552-1558
- Stouthamer, A.H.,
C. Bettenhausen (1973) Utilization of energy for growth and maintenance in continuous and batch cultures of microorganisms
B.B.A. 301, 53-70
- Tanaka, M., M. Haniu,
G. Matsueda, K. Yasunobu,
R.H. Himes, J.M. Akagi,
E.M. Barnes, T.Cevanathan (1971) The primary structure of the Clostridium tartarivorum ferredoxin, a heat-stable ferredoxin
J.Biol.Chem. 246, 3953-3960
- Tansey, M.R., T.D. Brock (1972) The upper temperature limit for eukaryotic organisms
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 69, 2426-2428
- Tischer, R.G.,
H. Hurwicz (1954) Thermal characteristics of bacterial populations
Food Res. 19, 80
- Vallentyne, J.R. (1963) Environmental biophysics and microbial ubiquity
Ann.N.Y.Acad.Sci. 108, 342
- Ward, J.,
A. Cockson (1972) Studies on a thermophilic bacillus: its isolation, properties and temperature coefficient of growth
J. Bacteriol. 112, 1040-1042
- Wedler, F.C.,
F.M. Hoffmann (1974) Glutamine synthetase of Bacillus stearothermophilus;I. Purification and basic properties
Biochemistry 13, 3207-3214

Williams, G.B.,
W.J. Robertson (1954)

J. Bacteriol. 67, 377

Zablocki, B.,
L. Sedlaczek,
E. Czerniawski (1967)

Bilan thermique de la culture
d'*Escherichia coli* dans des milieux
synthétiques additionnées de glucides
comme seule source d'énergie et de
carbone
in: Les développements récents de la
microcalorimétrie et de la thermogénèse,
pp. 395-402
C.N.R.S., Paris

Zeikus, J.G.,
A.W. Taylor, T.D. Brock
(1970)

Thermal stability of ribosomes and
RNA from *Thermus aquaticus*
B.B.A. 204, 512-520

Zeikus, J.G., T.D. Brock
(1971)

Protein synthesis at high temperatures:
aminoacylation of tRNA
B.B.A. 228, 736-745

Zeikus, J.G., R.S. Wolfe
(1972)

Methanobacterium thermoautotrophicus
sp. n., an anaerobic, autotrophic,
extreme thermophile
J. Bacteriol. 109, 707-713

Zeikus, J.G., R.S. Wolfe
(1973)

Fine structure of *Methanobacterium*
thermoautotrophicum: effect of growth
temperature on morphology and
ultrastructure
J. Bacteriol. 113, 461-467

Die Untersuchungen für die vorliegende Arbeit wurden in der Zeit von Dezember 1972 bis August 1975 in der Arbeitsgruppe Biophysik des Zentralinstitutes für Biochemie und Biophysik der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Ich danke Herrn Dr. I. Lamprecht für die Anregung zu dieser Arbeit.

Frau C. Umlauf hat mir bei einem Teil der Experimente durch gewissenhafte technische Assistenz sehr geholfen, wofür ich mich herzlich bedanke. Sie hat darüber hinaus dankenswerterweise auch die Reinzeichnung sämtlicher Abbildungen übernommen.

Viele Mitglieder des Zentralinstitutes aus den Arbeitsgruppen Biophysik, Strahlenbiologie und Molekularbiologie haben durch anregende Diskussionen und vielfältige Unterstützung den Fortgang der Arbeit wesentlich gefördert. Ihnen allen danke ich vielmals.

Besonderen Dank schulde ich den beiden Gutachtern, Herrn Prof. Dr. W. Laskowski und Herrn Dr. U. Reichert, für eine Reihe wertvoller Hinweise und Vorschläge, die in diese Arbeit mit eingeflossen sind.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Frau, Sigrid Reiling, für die Fertigstellung des Manuskripts und meinem Sohn Jesko, der durch den Verzicht auf Spiele und Unternehmungen während besonders arbeitsintensiver Zeiten nichts von seiner Fröhlichkeit und Zuneigung verloren, aber eigentlich nie so ganz eingesehen hat, warum sein Vater ständig "ins Institut arbeiten gehen mußte".

LEBENS LAUF

Am 11.12.1944 wurde ich als Sohn des Rektors Ernst Reiling und der Lehrerin Erna Reiling, geb. Halbach, in Letmathe, Kreis Iserlohn, geboren.

Von 1951 bis 1964 besuchte ich die Volksschule in Letmathe und das Gymnasium in Hohenlimburg. Zum Sommersemester 1964 wurde ich an der Universität Göttingen im Fach Physik immatrikuliert.

Im November 1966 bestand ich die Vordiplomprüfung in Physik.

Im Sommersemester 1968 begann ich meine Diplomarbeit bei Prof. Dr. E.H. Schröter an der Universitätssternwarte Göttingen. Im April 1970 legte ich die Diplomprüfung für Physiker ab.

Vom 1.1.1970 bis 31.7.1970 war ich wissenschaftliche Hilfskraft an der Sternwarte Göttingen.

Von Januar bis April 1971 war ich Teilzeitassistent am Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik der Freien Universität Berlin, seit dem 1.5.1971 bin ich wissenschaftlicher Assistent in der Arbeitsgruppe Biophysik des Zentralinstitutes.

difo-druck · 8600 bamberg
untere königstraße 30